

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:  
Identificación molecular de las especies del género *Brugmansia* (Solanaceae),  
presentes en la zona norte de los Andes del Ecuador**

**AUTOR:  
EDISON DAVID ESCOBAR MENA**

**TUTOR:  
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

**Quito, abril 2018**

### **Cesión de derechos de autor**

Yo, Edison David Escobar Mena con cedula de ciudadanía N° 0502476195, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud soy autor del trabajo de titulación titulado: “Identificación molecular de las especies del género *Brugmansia* (SOLANACEAE), presentes en la zona norte de los Andes del Ecuador”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la universidad facultada para ejercer los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado por la ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento al momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(f).....



Edison David Escobar Mena

C.C. 0502476195

Quito, abril 2018

### **Declaración de coautoría del docente tutor**

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:  
“Identificación molecular de las especies del género *Brugmansia* (SOLANACEAE),  
presentes en la zona norte de los Andes del Ecuador”, realizado por Edison David Escobar  
Mena, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la  
Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.



(f).....

Marco Fernando Cerna Cevallos

C.C. 0501872071

Quito, abril 2018

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a Dios por darme la sabiduría y las fuerzas necesarias para poder llevar a cabo todos mis objetivos propuestos. A mi Padre José que con su ejemplo ha sido un pilar importante en mi vida, siempre llevándome hacia el éxito. A mi Madre Mercedes por estar siempre pendiente de mí y brindarme su apoyo en todo momento. Y a mi Tía Marlene por ser como una segunda madre para mí, por todos sus cuidados y consejos. Gracias por ser la motivación que necesite para lograr culminar una etapa importante en mi vida, con sus acciones y enseñanzas buscare un mejor futuro.

Con esfuerzo y dedicación todo es posible. ¡El éxito está en creer en ti mismo!

Edison Escobar

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana, por su calidad de docentes a quien debo los conocimientos adquiridos, a las instalaciones del laboratorio de Ciencias de la Vida por su apertura para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mí estimado tutor Marco Cerna PhD por su apoyo y guía prestada en cada fase de este proyecto y sobre todo su calidad de persona para una motivación continúa.

Al Jardín Botánico de Quito por proporcionar material y conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

## Índice

Introducción .....	1
1 Marco Teórico.....	3
1.1 Género Brugmansia (Solanaceae) .....	3
1.2 Características .....	4
1.3 Composición química.....	5
1.4 Cultivos .....	7
1.5 Usos .....	8
1.5.1 Medicinal.....	8
1.5.2 Farmacológico.....	9
1.5.3 Ancestral .....	10
1.5.4 Ornamental.....	10
1.6 Plagas.....	11
1.7 Especies .....	12
1.8 Toxicidad.....	15
1.8.1 Toxicocinética .....	15
1.9 Identificación molecular .....	16
1.9.1 Extracción de ADN .....	17
1.9.2 PCR .....	17
1.9.3 Secuenciación.....	18
1.9.4 Método Barcode .....	18
1.9.5 Filogenia.....	19
2 Metodología .....	20
2.1 Colección de Plantas: .....	20
2.2 Extracción de ADN .....	21
2.2.1 Proceso de Extracción simple de hojas por Doyle y Doyle Modificado....	21
2.3 Electroforesis .....	22
2.4 Amplificación .....	24
2.5 Secuenciación .....	25
2.6 Filogenia.....	26

3	Resultados y Discusión.....	27
3.1	Colección.....	27
3.2	Extracción de ADN .....	27
3.3	Amplificación.....	28
3.3.1	Región <i>matK</i> .....	28
3.3.2	Región <i>rpoB</i> .....	29
3.3.3	Región <i>rpoC1</i> .....	30
3.4	Secuenciación Sanger.....	30
3.5	Análisis Bioinformático .....	32
3.5.1	Alineamiento .....	33
3.6	Filogenia.....	35
3.6.1	Región <i>matK</i> .....	35
3.6.2	Región <i>rpoB</i> .....	38
3.6.3	Región <i>rpoC1</i> .....	39
3.6.4	Regiones concatenadas.....	41
3.7	Distribución .....	43
4	Conclusiones.....	47
5	Recomendaciones .....	49
6	Bibliografía .....	50
7	Anexos .....	64

## Índice de Tablas

Tabla 1. Compuestos químicos presentes en <i>Brugmansias</i> .....	7
Tabla 2. Especies del género <i>Brugmansia</i> presentes en Ecuador .....	13
Tabla 3. Primers para amplificación de regiones de ADN.....	24
Tabla 4. Instrucciones de los ciclos para reacciones de PCR .....	25
Tabla 5. Cantidad de muestras de <i>Brugmansia</i> colectadas en diferentes provincias del Ecuador .....	27



## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de los alcaloides presentes en <i>Brugmansias</i> .....	5
Figura 2. Gel de agarosa al 1% con muestras de ADN de especies del género <i>Brugmansia</i> .....	28
Figura 3. Gel de agarosa al 1% con muestras amplificadas de <i>Brugmansias</i> de la región <i>matK</i> .....	29
Figura 4. Gel de agarosa al 1% con muestras amplificadas de <i>Brugmansia</i> de la región <i>rpoB</i> .....	29
Figura 5. Gel de agarosa al 1%, con muestras amplificadas del género <i>Brugmansias</i> en la región <i>rpoC1</i> .....	30
Figura 6. Resultados generados por Blast, GenBank .....	31
Figura 7. Descripción de la secuencia de <i>Brugmansia arborea</i> .....	32
Figura 8. Análisis de Secuencia para verificar calidad .....	33
Figura 9. Filogenia de las especies del género <i>Brugmansia</i> , usando la región <i>matK</i> y el método Neighbor-Joining Tree (Bootstrap 1000 repeticiones) .....	37
Figura 10. Filogenia de las especies del género <i>Brugmansia</i> , usando la región <i>ropB</i> y el método Neighbor-Joining Tree (Bootstrap 1000 repeticiones) .....	39
Figura 11. Filogenia de las especies del género <i>Brugmansia</i> , usando la región <i>ropC1</i> y el método Neighbor-Joining Tree (Bootstrap 1000 repeticiones) .....	41
Figura 12. . Filogenia de las especies del género <i>Brugmansia</i> usando las regiones <i>matK</i> , <i>rpoB</i> y <i>ropC1</i> mediante el método Neighbor-Joining Tree (Bootstrap 1000 repeticiones). .....	42
Figura 13. Puntos geográficos de especies del género <i>Brugmansia</i> presentes en Ecuador .....	44

## Índice de Anexos

Anexo 1. Tabla de Georreferencias de muestras de <i>Brugmansias</i> .....	64
Anexo 2. Preparación de reactivos para extracción de ADN.....	67
Anexo 3. Reactivos para electroforesis y gel de agarosa .....	68
Anexo 4 Resultados de la extracción de ADN y Amplificación.....	69
Anexo 5. Preparación de muestras para secuenciación.....	72
Anexo 6. Resultados de Blastn de la secuenciación de muestras de <i>Brugmansia</i> .....	73
Anexo 7. Resultados de Bold system de la secuenciación de muestras de <i>Brugmansia</i> .	78
Anexo 8. Calidad de las secuencias .....	82
Anexo 9. Alineamiento de secuencias de la región <i>rpoB</i> de especies del género <i>Brugmansia</i> .....	83

## Resumen

Las especies del género *Brugmansia* poseen sustancias tóxicas alcaloideas que se usan para elaborar sustancias psicotrópicas. Su ingestión en humanos y animales resulta fatal en dosis excesivas. En el Ecuador se conocen 7 especies, de las cuales 5 se han registrado en la zona andina, las especies son: *Brugmansia arborea*, *B. aurea*, *B. x candida*, *B. suaveolens*, *B. insignis*, *B. versicolor*, *B. sanguinea* y *B. vulcanicola*. Se recolectó muestras en varias provincias del Ecuador: Carchi, Pichincha, Cotopaxi, Napo y Morona Santiago. Obteniéndose 40 muestras de diferentes especímenes del género, a las cuales se les extrajo ADN por el método Doyle & Doyle modificado, posteriormente se amplificó segmentos de las regiones *matK*, *rpoB* y *rpoC1*, mediante la técnica PCR convencional, luego los productos fueron secuenciados a través de la técnica Sanger y analizados con las herramientas bioinformáticas: Boldsystems y Blast para verificar la identidad de las especies. Se elaboraron 4 árboles filogenéticos, 1 por cada región y 1 árbol concatenando las 3 regiones, para esto se utilizó el método Neighbor Joining Tree del software Mega 7; la región *matK* permitió elaborar un árbol que evidencia la agrupación de especies, esto en concordancia con la distribución geográfica de las mismas. La región *rpoB* mostró menor diferencia de grupos demostrando poca variabilidad del gen. Adicionalmente se estudió la distribución geográfica del género *Brugmansia* en Ecuador, determinando que el punto de diversificación de las especies se localiza en la zona nor-oriental de los Andes.

**Palabras Clave:** *Brugmansia*, ADN, filogenia, diversificación, *matK*, *rpoB* y *rpoC1*

## Abstract

The *Brugmansia* species possess toxic alkaloid substances that are used to make psychotropic substances. Its ingestion in humans and animals is fatal in excessive doses. In Ecuador 7 species are known, of which 5 have been registered in the Andean zone, the species are: *Brugmansia arborea*, *B. aurea*, *B. x candida*, *B. suaveolens*, *B. insignis*, *B. versicolor*, *B. sanguinea* and *B. vulcanicola*. Samples were collected in several provinces of Ecuador: Carchi, Pichincha, Cotopaxi, Napo and Morona Santiago. Obtaining 40 samples of different specimens of the genus, to which DNA was extracted by the modified Doyle & Doyle method, later amplified segments of the *matK*, *rpoB* and *rpoC1* regions, by means of the conventional PCR technique, then the products were sequenced through of the Sanger technique and analyzed with the bioinformatic tools: Boldsystems and Blast to verify the identity of the species. 4 phylogenetic trees were developed, 1 for each region and 1 tree concatenated the 3 regions, for this the Neighbor Joining Tree method of Mega 7 software was used; the *matK* region allowed the elaboration of a tree that shows the grouping of species, this in accordance with the geographical distribution of the same. The *rpoB* region showed less difference of groups demonstrating little variability of the gene. Additionally, the geographical distribution of the *Brugmansia* genus in Ecuador was studied, determining that the diversification point of the species is located in the north-eastern zone of the Andes.

**Keywords:** *Brugmansia*, DNA, phylogeny, diversification, *matK*, *rpoB* and *rpoC1*

## Introducción

El género *Brugmansia* pertenece a la familia Solanaceae, las especies de este género son nativas de las regiones subtropicales de Sudamérica, a lo largo de los Andes de Colombia hasta el norte de Chile e incluso el sudeste de Brasil; entre sus varios nombres comunes el más conocido es el “floripondio”, estas plantas producen altas cantidades de alcaloides, los principales son la escopolamina y los tropanos, estos puede causar graves problemas de salud si se los ingiere en grandes cantidades (Citver, 2017).

En el pasado el género *Brugmansia* estaba dentro del género *Datura*, del cual se diferencia por sus flores pedunculadas, sus condiciones arbustivas y sus frutos no armados e indehiscentes, por otro lado *Datura* es herbácea con flores erectas y frutos armados (Álvarez, 2008).

En análisis moleculares previos para la familia Solanaceae, encontramos estudios como “Filogenia molecular de las Solanaceas”, que mostró la relación de 89 géneros con 190 especies basándose en las regiones de ADN del cloroplasto *ndhF* y *trnLF* (Olmstead et al., 2008)

Además se tiene amplios estudios moleculares en el género *Datura* perteneciente a la Familia Solanaceae, como estudios moleculares de plantas medicinales del género *Datura* usando el Barcode de *ITS2* (Wu, Xu, Cheng, Wang, y Zhao, 2015). *Datura* y *Brugmansia* comparten cierta similitud en apariencia, por lo que en el pasado formaban parte del mismo género, ahora su diferenciación morfológica los separa, pero no se ha encontrado estudios moleculares de todas las especies de estos géneros. Investigaciones del género *Datura* lo diferencian del género *Brugmansia* como lo expone Bye y Sosa (2013), en su investigación “Filogenia molecular del género *Datura* jimsonweed (Solanaceae)”

Las *Brugmansias* han ido perdiendo su uso ancestral para convertirse en plantas ornamentales, por lo cual para la obtención de nuevas variedades, la hibridación es una técnica común utilizada en este género; en los Andes Ecuatorianos podemos encontrar 7 especies según Hay, Gottschalk y Holguin (2012) entre ellas esta *Brugmansia versicolor* endémica de Ecuador y *Brugmansia x candida* que es un híbrido entre *Brugmansia aurea* y *Brugmansia versicolor*, misma que es estudiada para ser utilizada en reforestación como menciona Ruiz (2013) en su investigación “Micropropagación in vitro de floripondio blanco (*Brugmansia x candida*) como estrategia de los programas de arborización para el Distrito Metropolitano de Quito”

EL objetivo del presente estudio es identificar molecularmente las especies del género *Brugmansia* presentes en la zona norte de los Andes del Ecuador con el fin de comprender su proceso filogenético.

Para esta investigación se colectaron muestras botánicas de especies del género *Brugmansia* en 5 provincias del Ecuador, de las cuales se extrajo ADN foliar. Se amplificó las regiones de ADN correspondientes a (*matK*, *rpoB* y *rpoC1*) por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) convencional, después las muestras fueron secuenciadas por el método Sanger automatizado, finalmente se analizó la filogenia en el programa Mega7 y la distribución de las especies mediante el software Diva gis.

## Capítulo 1

### Marco Teórico

#### 1.1 Género *Brugmansia* (Solanaceae)

Con el nombre de *Brugmansia* se identifica a aquellas plantas fanerógamas pertenecientes a la familia SOLANACEAE que crecen en regiones subtropicales de Sudamérica, en especial en países como Colombia, Chile, Ecuador y Perú (Tropicos, 2017). Por su parte Bohs (2015), señala que esta familia de plantas posee un alto grado de importancia económica como es el caso del tabaco (*Nicotiana tabacum*), debido a que contienen alcaloides que son utilizados como drogas o alucinógenos; aunque muchas de estas especies son cultivadas con fines ornamentales, ya que suelen crecer de manera libre en jardines o huertos donde existen condiciones adecuadas para su crecimiento.

Investigadores como Álvarez (2008) manifiestan que las especies del género *Brugmansias* se las conoce con diferentes nombres, por ejemplo en Colombia se las conoce con el nombre de Borrachera, debido a los usos que tiene esta planta relacionados con los alcaloides que posee, en especial de la escopolamina, que es un alcaloide cuaternario hidrosoluble de rápida absorción que actúa como antagonista de la acetilcolina en los receptores muscarínicos; es frecuente la intoxicación con fines delictivos, cuando se utiliza con depresores del sistema nervioso central en una mezcla conocida como “burundanga”; otras denominaciones de esta planta corresponden a floripondio y trompeta de ángel, debido a la belleza de sus flores y la diversidad de sus colores, además que también se le suele llamar cacao sabanero, debido a los frutos que posee y que se asemejan a los producidos del arbusto cacaotero, además crecen en lugares abiertos, despejados como bordes de praderas, caminos y cañadas (págs. 79-80).

Las especies de *Brugmansia* se pueden encontrar en diferentes hábitats por ejemplo en zonas húmedas o secas, están presentes en altiplanos andinos y áreas adyacentes en altitudes que van desde los 600 a 3700 metros sobre el nivel del mar (Díaz, 2015).

## **1.2 Características**

Las plantas pertenecientes al género *Brugmansia* se presentan en formas de árboles o arbustos “a veces epífitos o hemiepífitos, hermafroditas o raramente andromonoicos, indumentados con tricomas simples, dendríticos, equinoides o estrellados, glandulares o eglandulares”, que llegan a presentar alturas comprendidas entre los tres y diez metros (Bohs, 2015).

Preissel y Preissel (2002), mencionan que el género *Brugmansia* posee flores en forma de péndulos que pueden medir hasta 30 cm de largo, además se caracterizan por presentar colores como el blanco, amarillo, naranja, rosa y rojo; sus bayas son obovadas, pueden ser largas y contener más de 300 semillas, su perfume se percibe generalmente en la noche, atrayendo a insectos nocturnos y murciélagos que intervienen en el proceso de polinización.

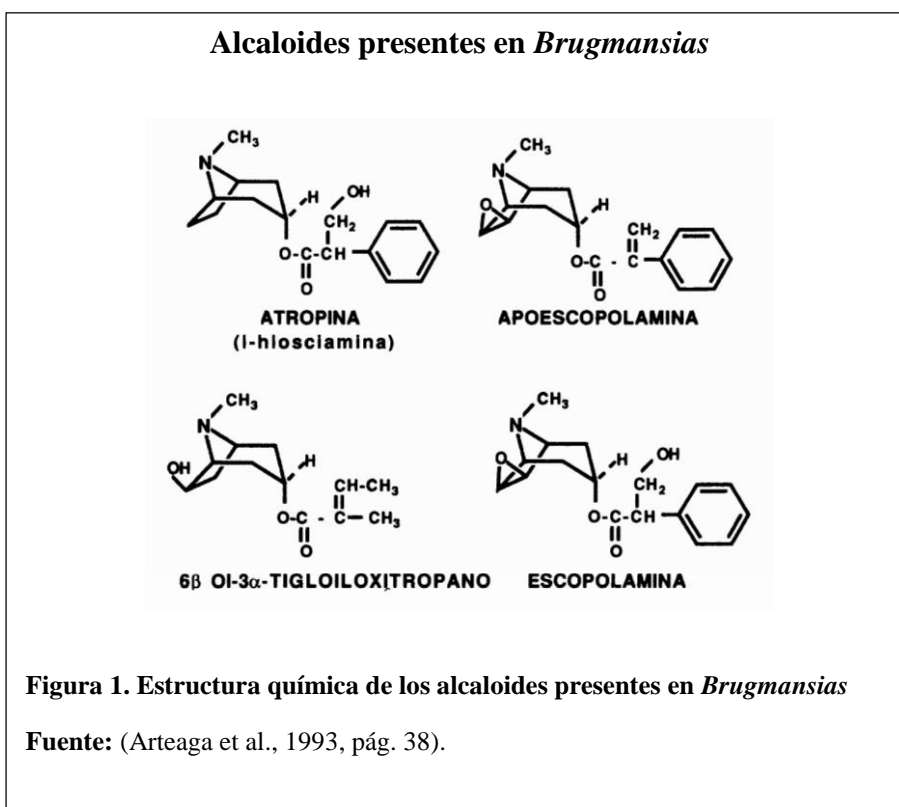
Por otro lado Palacios (2010) señala que la flor de *Brugmansia* presenta una corola tubular, lisa, muy fragante y provista de lóbulos; el androceo (parte masculina de la flor) está constituido por cinco estambres iguales, insertados hacia la mitad del tubo de la corola, las anteras se fijan por la base y son un tanto oblongas, pubescentes, se abren de manera longitudinal; el gineceo (parte femenina de la flor) posee un pistilo central con un largo estilo y un estigma bilobulado, el néctar es producido en la base de la corola (zona nectarial).



Las hojas de *Brugmansia* son simples con márgenes enteros y una textura aterciopelada debido a abundantes tricomas (Victoria Avenue Forever, 2015).

Además Palacios (2010) señala que estas se caracterizan por ser alternas y pecioladas; el peciolo es flexible y redondo, la lámina es lanceolada y posee un ápice agudo, su base va de oblicua a obtusa, tiene haz pubescente, y su envés es de color verde claro con pubescencia (pág. 19).

### 1.3 Composición química



Según lo manifiestan Pino y Alvis (2009), las plantas pertenecientes al género *Brugmansia* contienen distintas clases de alcaloides como “la escopolamina, nioscamina, atropina, hiosina, hiosiamina, norhyocine, apohyocine, (-)-3a-Tigloyloxy-6~-acetoxytropane, d3a-Acetoxytropane y variados alcaloides del grupo tropano, tales como norescopolamina,

aposcopolomina, metelodina, siendo la escopolomina la que aparece en mayor proporción”(pág. 125).

El aporte de, Arteaga y otros (1993) señala que en algunas investigaciones desarrolladas en países como Colombia se logró determinar que los alcaloides expresados como atropinas de las plantas de *Brugmansias* se encuentran distribuidos en un 0.34% en las hojas, un 0,15% en los tallos, un 0,16% en los frutos verdes, un 0,24% en las semillas y un 0.38% en sus flores, razón por la cual estas plantas suelen ser utilizadas dentro del contexto farmacéutico, debido a su estructura.

Entre sus propiedades químicas, Palacios (2010) refiere que en el género *Brugmansia* contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios, en especial de aquellos alcaloides que se derivan de los grupos del Nicotina, Higrina, Tropano y Amidas, que proveen un amplio rango de ácidos grasos, Flavonoides, distintos grupos de Esteroides, Di y Tri Terpenos; compuestos que se utilizan dentro del contexto de la medicina, así como de la toxicología, ya que son utilizados en algunos casos como insecticidas, además como lo señala esta investigadora, las plantas pertenecientes al género *Brugmansia* poseen otros compuestos secundarios que corresponden a aquellos del tipo Tropano, en especial a la Hioscina que se la conocen comúnmente con el nombre de Escopolamina, compuesto que suele ser utilizado como parte de una droga que es utilizada para someter la voluntad de la víctima para efectuar robos, debido a que la persona es empujada a realizar toda clase de acciones sin que ofrezca alguna clase de resistencia.

**Tabla 1. Compuestos químicos presentes en *Brugmansias***

RI	Compound	Percent Composition	
		“white”	“rose”
900	Heptanal	0.1	10.2
997	Octanal	---	1.0
1031	1,8-Cineole	72.1	2.0
1045	Phenylacetaldehyde	0.9	---
1050	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	2.6	4.2
1059	$\gamma$ -Terpinene	1.1	1.6
1099	Linalool	---	0.4
1106	Nonanal	1.8	17.4
1116	Phenethyl alcohol	3.2	---
1178	Terpinen-4-ol	1.3	10.5
1182	2-Isobutyl-3-methoxypyrazine	---	0.5
1193	$\alpha$ -Terpineol	5.3	1.1
1283	unidentified	---	1.7
1288	Theaspirane A	t	1.4
1302	Theaspirane B	t	1.1
1560	Megastigmatrienone I	---	1.7
1565	( <i>E</i> )-Nerolidol	11.7	1.9
1579	Megastigmatrienone II	---	24.5
1610	Megastigmatrienone III	---	0.8
1624	Megastigmatrienone IV	t	8.5
2500	Pentacosane	t	1.5
2700	Heptacosane	t	6.4
2900	Nonacosane	t	1.1
3100	Hentriacontane	t	0.4

**Nota:** Compuestos químicos extraídos del aceite esencial de flores de *Brugmansia suaveolens* con coloración rosa y blanca

**Fuente:**(Anthony, Zuchowski, y Setzer, 2009, pág. 78)

## 1.4 Cultivos

Las plantas pertenecientes al género *Brugmansia* crecen con facilidad en climas cálidos con suelos húmedos y fértiles, pues en el caso de lugares con temperaturas bajas, es necesario que se establezcan condiciones específicas que contribuyan a proteger su raíz y garantizar su crecimiento, para que la reproducción de la *Brugmansia* se efectúe con normalidad, se inserta pequeños cortes de sus ramas de 10 a 20 cm que se los introduce en la tierra durante el verano, época en la cual existen mejores condiciones climáticas para la siembra de esta planta (Preissel y Preissel, 2002).

Según Grant (2015), esta planta no se considera resistente, lo que significa que no puede soportar temperaturas de congelación, la tolerancia al frío en *Brugmansias* no pueden bajar a 10 o 15 grados Fahrenheit (-12 a -9 °C), por otro lado su cuidado en el verano no es más complicado que cualquier otra planta, siempre y cuando se obtengan 3 pulgadas de agua por semana como cantidad mínima de riego, también se debe utilizar un buen sustrato y espacio suficiente para el crecimiento prolongado de la raíz; las *Brugmansias* responden bien a la poda en primavera, esta consiste en cortar las puntas de la rama a un nodo de crecimiento, pero la planta también puede soportar una poda dura a unas pocas pulgadas del suelo.

## **1.5 Usos**

### **1.5.1 Medicinal**

En cuanto al uso que se hace de las plantas del género *Brugmansia*, autores como Pino y Alvis (2009), señalan que las hojas frescas suelen utilizarse para tratar erupciones de la piel, así como “para tratar áreas dolorosas en el caso de inflamaciones reumáticas o traumas, los vapores de la decocción de las hojas se utilizan como antiséptico vaginal” (pág. 125).

Flores (2011), refiere además que las *Brugmansias* se han utilizado con fines terapéuticos, especialmente para aliviar dolores corporales, cólicos intestinales, contra el asma, para aliviar la gripe común, de igual manera, las hojas de esta especie se usan para contrarrestar el dolor de cabeza, para lo cual se realizan cataplasmas con hojas frescas que son untados con grasas y ungüentos, también es común utilizar hojas machacadas para aliviar las úlceras que se generan en las encías o zona bucal afectada, además que se las usa para

desinflamar las glándulas parótidas, afección que generalmente conocida con el nombre de paperas (pág. 11).

### **1.5.2 Farmacológico**

En el contexto farmacológico se conoce que los alcaloides que poseen las *Brugmansias* son utilizados de diversas formas, tal como lo detalla Istituto Superiore di Sanità (2010) ya que la hiosciamina que forma parte de las *Brugmansias* es una sustancia de actividad anticolinérgica, en particular antimuscarínico, que actúa mediante el bloqueo de la acción de la acetilcolina a nivel del músculo nervioso autónomo parasimpático periférico liso y a nivel del sistema nervioso central; entre los efectos parasimpáticos se encuentran: 1) espasmolisis (músculo liso), 2) midriasis y parálisis del alojamiento visual, 3) disminución de la excreción exocrina, 4) taquicardia, 5) supresión de náuseas y vómitos; en cambio, la potencia de hiosciamina es aproximadamente dos veces mayor que la de la atropina, Su acción y uso son los mismos de antimuscarínicos en general, excepto por el hecho de que la hiosciamina no se utiliza en el campo oftalmológico, pero se utiliza casi exclusivamente como un fármaco antiespasmódico.

De igual manera autores como Barreto, Guzmán, y Gutiérrez (2016), mencionan que en las especies de *Brugmansias* se han aislado alcaloides del tropano, como hioscina, hiosciamina, y principalmente escopolamina y atropina; los alcaloides contenidos en la planta (más notablemente escopolamina) causan inhibición competitiva de los receptores muscarínicos (a nivel central y periférico), lo que resulta en la presentación clásica de un síndrome anticolinérgico visto en intoxicación por ‘floripondio. La escopolamina puede corregir los cambios en el equilibrio entre la acetilcolina y la noradrenalina, que pueden ocurrir en ciertas enfermedades motoras, además, utilizando extractos acuosos de

*Brugmansia arborea*, se ha demostrado que esta planta contiene sustancias que también interactúan como receptores serotoninérgicos (American Society of Health System Pharmacists y McEvoy, 2008).

### **1.5.3 Ancestral**

Arteaga y otros (1993), refieren que en países como Colombia las *Brugmansias* fueron usadas como medicinas y alucinógenos especialmente por pueblos nativos de las regiones andina y amazónica; es bien sabido que los Chibchas usaron las *Brugmansias* en ceremonias religiosas en el templo del sol, para producir un estado de inconciencia a las esposas y esclavos de los guerreros que morían, con el fin de enterrarlos vivos con ellos (pág. 37). En este mismo sentido, Pino y Alvis (2009) manifiestan que todas las especies del género *Brugmansia* han sido utilizadas como alucinógenos, diagnóstico y para tratar enfermedades, además que recientemente, (Lannacone, Ayala, y Roman, 2005) evaluaron la aplicación de *Brugmansia x candida* como biocida (pág. 125).

Otros investigadores como Dean (2009), señalan que en algunos pueblos de la Amazonia, las semillas de *Brugmansia* suelen ser utilizadas frecuentemente para la elaboración de bebidas chamánicas que producen diversas clases de alucinaciones, generando estados de alteración que pueden ir desde la alegría hasta el terror, además que las personas que las ingieren pierden el control sobre las acciones que llevan a cabo y por tanto son incapaces de escuchar o mirar lo que ocurre a su alrededor.

### **1.5.4 Ornamental**

Flores (2011) refiere que las *Brugmansias* son utilizadas dentro de la industria ornamental, debido a la diversidad de colores y formas que presentan, razón por la cual representan una fuente importante de ingresos en la economía de los países responsables de su

producción; algunos ejemplos son *Brugmansia x candida* (trompeta del ángel), cultivada por sus grandes flores péndulas con forma de trompeta.

Con relación a las *Brugmansias* utilizadas dentro de la industria ornamental, Mahr (2006) señala que existen diversidad de especies y cultivos que están disponibles para su compra, entre los que se incluyen principalmente a:

- *Brugmansia “Jamaican Yellow”*: esta se caracteriza por la presencia de flores de color amarillo limón que resultan muy fragantes
- *Brugmansia versicolor*: posee grandes y hermosas flores de color albaricoque pálido. Esta especie generalmente se la encuentra en Ecuador
- *Brugmansia “Ecuador Pink”*: es una variedad popular que posee hermosas flores rosadas, además que se caracteriza por presentar flores en forma de trompetas largas con bordes canelados que aparecen cada mes, en especial si existen condiciones climáticas óptimas.

## 1.6 Plagas

Mahr (2006) manifiesta además que estas plantas son muy atractivas para varias clases de insectos, en especial para las cochinillas, moscas blancas, ácaros y araña, razón por la cual, sino se controlan con fungicidas, es común que esta clase de animales puedan destruir a las plantas en su totalidad, estas plagas se controlan fácilmente con insecticidas que deben aplicarse regularmente a la parte inferior de las hojas (directamente sobre las plagas) para mantener a las poblaciones bajo control.

Los problemas fúngicos que afectan a *Brugmansias* incluyen el *Fusarium* y la marchitez de *Verticillium*, ambas enfermedades, que entran en la planta a través de las raíces y viajan

por el tallo, bloquean la transmisión del agua, causan crecimiento atrofiado y follaje marchitado, además la marchitez de *Fusarium* se observa generalmente en tiempo cálido, mientras que la *Verticillium* es más común cuando el clima es fresco (Dyer, 2015).

## 1.7 Especies





De acuerdo a lo manifestado por Flores (2011), la familia Solanaceae comprende 98 géneros y unas 2700 especies. El género *Brugmansia* es nativo de los bosques lluviosos de Centro y Sur América, especialmente en la región amazónica de Brasil y posiblemente partes vecinas de Bolivia y Perú, aunque los límites exactos de su origen son poco claras y pueden ser más amplias para incluir a Ecuador y Argentina (Cabi, 2016). Sin embargo las más importantes del género *Brugmansia* corresponden a las siguientes: *Brugmansia*: *B. arborea*, *B. x candida*, *B. aurea*, *B. sanguinea*, *B. versicolor*, *B. suaveolens*, *B. insignis* y *B. vulcanicola*, de las cuales las cinco primeras se encuentran presentes en la zona andina y en los páramos del Ecuador (Álvarez, 2008).

En la siguiente tabla se detallan las principales especies del género de *Brugmansia* en Ecuador, estableciendo algunas de sus características más importantes:



**Tabla 2. Especies del género *Brugmansia* presentes en Ecuador**

Especies	Características
<p><i>Brugmansia arborea</i></p> 	<p>Es un arbusto de dos a cinco metros de altura, perennifolio, cuyas flores blancas grandes pueden llegar a medir hasta 20 cm de largo, con prolongaciones caudiculares en la corola de hasta 5 cm, presentando un fruto ovalado. Se encuentra principalmente en países como Colombia, Venezuela, Bolivia, Ecuador y Perú.</p>
<p><i>Brugmansia x candida</i></p> 	<p>Sus flores péndulas pueden llegar a mediar hasta 30 cm de largo, con colores que van desde el blanco hasta el amarillo y el rosado, con caudas de hasta 6 cm de longitud, mientras que su fruto es ovoide o fusiforme. Se encuentra en países como Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela</p>
<p><i>Brugmansia aurea</i></p> 	<p>Se caracteriza por sus flores blancas o amarillo-doradas, que pueden medir entre cuatro a ocho cm de largo, y tienen anteras libres, además que sus principales registros se encuentran en países como Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.</p>
<p><i>Brugmansia sanguinea</i></p> 	<p>Se caracteriza por la presencia de flores tubulares, amarillas o verde amarillentas en la base, que se tornan rojas hacia el extremo abierto de la corola. Las hojas de esta especie contienen alrededor de un 0.8% de alcaloides totales, el mayoritario es la escopolamina. Se la encuentra principalmente en países como Colombia, Perú y Ecuador.</p>

<p><i>Brugmansia versicolor</i></p> 	<p>Se caracteriza por la presencia de flores que pueden medir hasta 50 cm de longitud. Su color es blanco, salmón o rosado, el tubo de la corola es muy estrecho hacia la base y se ensancha bruscamente a partir del primer tercio, hasta conformar la copa abierta en la cual cada uno de los lóbulos termina en una prolongación de hasta cinco cm. Entre los países en los cuales se encuentra esta planta se deben mencionar a Colombia, Ecuador y Perú.</p>
<p><i>Brugmansia suaveolens</i></p> 	<p>Se caracteriza por la presencia de flores grandes, que alcanzan hasta 35 cm de longitud, y las prolongaciones de los lóbulos de la corola están entre 1 y 3 cm. Se encuentra principalmente en países como Colombia, Perú y Ecuador</p>
<p><i>Brugmansia insignis</i></p> 	<p>Esta especie se diferencia por su cáliz rizado y porque su corola puede llegar a medir hasta de 40 cm de largo, presentando un color blanco o rosado, así como estambres con anteras libres o unidas. Se encuentra presente en la zona de frontera colombo-ecuatoriana y en el Perú.</p>
<p><i>Brugmansia vulcanicola</i></p> 	<p>Es una especie sudamericana de Trompeta de Ángel que crece como arbustos o pequeños árboles de hasta 4 m de altura. Las flores de forma tubular son las más pequeñas de todas las Brugmansia a sólo 15 a 22 cm (6 a 9 pulgadas). También tienen los picos más cortos de la corola de 0,5 a 1,5 cm (0,20 a 0,59 pulgadas). Las flores se pueden encontrar en tonos de rojo, amarillo y rosa. Se encuentran en Colombia y el norte de Ecuador.</p>

**Fuente:** Flores (2011), Quattrochi (2012), Preissel y Preissel (2002)

## **1.8 Toxicidad**

De acuerdo a lo manifestado por el Istituto Superiore di Sanità (2010), los efectos de una ingesta descontrolada de *Brugmansia* pueden ser muy graves, especialmente si la ingesta se asocia con alcohol o psicofármacos, ya que las personas pueden experimentar alucinaciones, delirios, convulsiones, alteraciones severas de la visión, llevándolas a un estado de y posteriormente la muerte; de esta manera.

La toxicidad inducida por escopolamina se caracteriza por un síndrome anticolinérgico clásico que se produce generalmente a causa de la ingestión de productos adulterados o las plantas que contienen la sustancia en cuestión, las manifestaciones resultantes de la ingesta de escopolamina incluyen alucinaciones y la incontinencia urinaria; las dificultades generadas a nivel cognitivo y en relación con la movilidad, inducidas por consumo de escopolamina se han demostrado ampliamente en animales de experimentación y en seres humanos; algunos casos de intoxicación por escopolamina han sido documentados en especial, por asociación con otro abuso de drogas por ejemplo la heroína (Dart, 2004).

### **1.8.1 Toxicocinética**

Hablando del componente más toxico la escopolamina que predomina en mayor cantidad en la planta Herrera (2017), dice que la absorción se produce por vía oral, su efecto puede durar alrededor de 30 a 60 minutos e incluso 1 a 3 horas, posee efectos agudos que pueden durar entre 24-48 horas y se puede prolongar hasta 2 semanas, dependiendo de la dosis ingerida; la forma de excreción o eliminación de esta sustancia es por la orina a partir de las 12 horas, a mayor edad el efecto es más prolongado, además la dosis letal en adultos

es alrededor de 100mg, pero pueden aparecer síntomas de intoxicación con dosis de 2 a 5 mg, mientras que en niños a partir de 10mg pueden ser letales.

De esta manera y en base a la información expuesta por los diversos autores se establece que las *Brugmansias* tienen distintos usos como la farmacología, la ornamentación, rituales chamánicos, así como para fines delictivos; además como se puede apreciar, el consumo de la escopolamina puede afectar de manera peligrosa a humanos y animales, razón por la cual en muchos países del mundo se encuentra prohibido su cultivo y comercialización; no obstante, tampoco se puede descartar los beneficios que se pueden extraer de este grupo de plantas, por lo cual es importante conocer su composición química y tener identificadas las especies de interés. El estudio molecular puede definir las especies existentes de este género en Ecuador, así como entender su desarrollo filogenético, su distribución en el territorio y por último tener las secuencias en base datos bioinformáticas de estas especies.

### **1.9 Identificación molecular**

La identificación molecular se refiere al estudio de secuencias de ADN mediante las cuales se puede identificar o diferenciar individuos de una misma familia, por lo cual es necesario tener información previa de la secuencia a ser estudiada, es decir genes que sirvan como marcadores moleculares o un genoma completo para la comparación de secuencias como Baloglu *et al.* (2015), lo mencionan en su estudio de expresión de genes RPL24 en tres miembros de la familia Cucurbitaceae. La identificación molecular se realiza mediante la extracción del ADN presente en las células (Gonzalez, 2014). Sobre este material se utiliza la técnica: Reacción en cadena de la polimerasa PCR que puede ser usado para amplificar una o varias copia de ADN a través de varios órdenes de magnitud,

generando miles de copias de una secuencia específica de ADN (Sahil, Tejas, Hiren, Pratibha, y Abhay, 2015).

Posteriormente la cadena amplificada necesita ser interpretada mediante el proceso de secuenciación; estos datos son analizados mediante programas informáticos que comparan las secuencias obtenidas con secuencias guardadas en bibliotecas genómicas.

### **1.9.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN es un procedimiento utilizado para aislar el ADN del núcleo, mitocondrias y cloroplastos de las células; el primer paso es romper células para liberar el ADN, se pueden utilizar métodos físicos como maceración o molienda para atravesar las membranas celulares con ayuda de un detergente y una solución buffer, a continuación es necesario la separación de ADN de proteínas y otros desechos celulares, para obtener una muestra limpia de ADN, se debe eliminar los desechos, esto se realiza mediante la adición de una proteasa (enzima proteínica) para degradar las proteínas asociadas al ADN y otras proteínas celulares, después se precipita el ADN con un alcohol, para esto se añade cuidadosamente a la muestra de ADN alcohol en frío (isopropanol); de esta forma el ADN se precipita, por último se limpia el ADN puede ser con lavados de etanol y finalmente se resuspende en un tampón ligeramente alcalino (Sciencelearn, 2009).

### **1.9.2 PCR**

PCR convencional (Reacción en cadena de la Polimerasa), es un ensayo enzimático simple, que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico, requiere la presencia de ADN molde, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa; la ADN polimerasa es la enzima clave que une los nucleótidos individuales para formar el producto de la PCR, los nucleótidos incluyen las cuatro bases adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C, G),

estos actúan como los bloques de construcción que son utilizados por la ADN polimerasa para crear el producto de PCR resultante (Garibyan y Avashia, 2013). Hay tres pasos principales involucrados en la técnica de PCR: desnaturalización, hibridación y extensión; el ADN se desnaturaliza a altas temperaturas (de 90 a 97 grados Celsius) después, los primers reconocen un segmento específico de ADN a (50-60 grados Celsius), donde una enzima llamada Taq polimerasa une los nucleótidos libres, formando una nueva cadena complementaria de ADN a (72 grados Celsius), después de 25-30 ciclos, quien esté realizando el proceso de PCR en una muestra de ADN tendrá un montón de copias de la muestra original de ADN (Joshi y Deshpande, 2011).

### **1.9.3 Secuenciación**

El término secuenciación de ADN se refiere a métodos para determinar el orden de los nucleótidos bases adenina, guanina, citosina y timina en una molécula de ADN (Bharti Rajendra Kumar, 2012). La secuenciación Sanger es un método donde el ADN diana se desnaturaliza, se hibrida con un cebador de oligonucleótidos, que luego se extiende mediante ADN polimerasa utilizando una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP normales) y didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) que terminan en cadena; los ddNTP carecen del grupo 3' OH al que se agrega el siguiente dNTP de la cadena de ADN en crecimiento, las cadenas de ADN recién sintetizadas resultantes serán una mezcla de longitudes, estas secuencias son leídas en geles de acrilamida en electroforesis vertical que revela la posición de cada base en la secuencia. (Applied Biosystems, 2009, pág 3)

### **1.9.4 Método Barcode**

El Consorcio del Código de Barras de la Vida (Consortium for the Barcode Of Life (CBOL); [www.barcodinglife.com](http://www.barcodinglife.com)) pretende identificar, mediante códigos de barras

genéticos basados en secuencias de ADN, a todos los organismos del planeta; el objetivo es emplear un método estandarizado, rápido y fiable, en el que unas secuencias específicas de una muestra permitan adscribirla a la especie a la que pertenece, clasificando así molecularmente a toda la biodiversidad. Para las plantas, el grupo botánico del CBOL y otros autores han recomendado el uso de ciertos genes cloroplásticos (*rbcL*, *matK*, *trnLF*) y genes nucleares multicopia (*ITS*) (López-Alvarez, López-Herranz, Betekhtin, y Catalán, 2012).

### **1.9.5 Filogenia**

Yang y Rannala (2012), señalan que antes del advenimiento de las tecnologías de secuenciación del ADN, los árboles filogenéticos fueron utilizados casi exclusivamente para describir las relaciones taxonómicas, hoy en día, las filogenias se utilizan para describir las relaciones entre miembros de una familia, las historias de poblaciones y la dinámica evolutiva; además señalan que una filogenia es un árbol que contiene nodos que están conectados por ramas, cada rama representa la persistencia de un linaje genético a través del tiempo, y cada nodo representa el nacimiento de un nuevo linaje.

El uso de datos moleculares en la taxonomía vegetal ha tenido éxito en muchos casos, pero tiene limitaciones como que las tecnologías actuales no utilizan el genoma completo usualmente sólo revelan parcialmente las relaciones evolutivas entre las plantas (Liu, Abdullah, Huang, y Nishioka, 2017).

## Capítulo 2

### Metodología

#### 2.1 Colección de Plantas:

Para la colección de plantas, se buscó la posible ubicación de las mismas mediante la página web Tropicos (2017), donde se pueden consultar los puntos de colección de las especies estudiadas por distintos botánicos.

Los datos obtenidos de Tropicos, proporcionaron referencias geográficas con las cuales se procedió a coleccionar muestras de cada especie del género *Brugmansia*; se tomó dos tipos de muestras: una para el herbario de la Universidad Politécnica Salesiana y otra para la obtención de ADN, las muestras debían tener hojas y flores, que sirvieron para elaborar una muestra para herbario, así como para la respectiva identificación morfológica (Anexo1), los datos de las muestras (ubicación, fecha, colectores) fueron ingresados al libro de campo de Marco Cerna rango 3288 hasta 3515, por otro lado las muestras fueron debidamente etiquetadas y prensadas.

Las muestras para obtención de ADN consistieron en hojas jóvenes, las cuales se guardaron en sobres de papel y luego fueron almacenadas en bolsas plásticas con cierre hermético conteniendo 20 g. de silica gel.

Después de la colección se procedió al secado de las muestras para herbario, se realizó usando dos tablas que presionan a los especímenes, que se encuentran envueltos en material absorbente (papel periódico), al secar las muestras se evita la descomposición, la presencia de hongos u insectos presentes en las mismas en el momento de la colección,



este procedimiento se realizó en una estufa a una temperatura de 60° C, durante dos días (Arnelas, Invernón, González, López, & Devesa, 2012).

Para la colección de muestras de tejido destinado a la extracción de ADN se eligieron hojas juveniles (brinda los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de ADN extraído), con menos impurezas, contaminantes y patógenos (roya o picaduras de insectos); las muestras se almacenaron en sobres de papel a los cuales se les asigna un código registrado en un libro de campo (Marco Cerna). Entre los compuestos más comunes que pueden impedir la extracción del ADN e inhibir la amplificación son: polifenoles, polisacáridos, metabolitos secundarios, antocianinas y lignina presentes en mayor cantidad en hojas maduras (Luna y Nikichuk, 2014).

## **2.2 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN foliar se utilizaron dos métodos el primero de Doyle & Doyle modificado y el segundo a través de un kit de extracción: Phire Plant Direct PCR Master Mix Thermo scientific, mismo que permite realizar PCR sin necesidad de una extracción previa de ADN (Se detalla el procedimiento en la sección 2.4 Amplificación).

### **2.2.1 Proceso de Extracción simple de hojas por Doyle y Doyle Modificado**

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a lo señalado por Soltis (2002), que refiere al método Doyle & Doyle modificado; los reactivos usados para este procedimiento se prepararon previo a la extracción (Anexo 2). Primero se coloca 50 g de muestra en micro tubos de 2 mL etiquetados, a estas muestras se las pulveriza añadiendo nitrógeno líquido y triturándolas con una varilla de vidrio limada, en seguida se agrega 600 µL de Buffer de extracción Lisis (0,6055 g de Tris, 0,74 g de EDTA, 1,461 g NaCl y 50 mL de Agua destilada), esta combinación se mezcla en un vórtex durante 1 minuto, hasta obtener un

color homogéneo, posteriormente se adiciona 94  $\mu\text{L}$  de detergente SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10 %, esto se homogeniza por inversión de 5 a 8 veces, después se somete la muestra a 65 °C durante 10 minutos con la ayuda de un termobloque. A continuación se añade 118,5  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 5 M, se homogeniza por inversión de 5 a 8 veces, y se coloca en hielo durante 5 minutos, luego las muestras son centrifugadas durante 5 minutos a 13000 rpm, se forman dos fases, la superior se trasvasa a un nuevo microtubo 2ml incluyendo los micelios flotantes; en el nuevo tubo se añade 600  $\mu\text{L}$  de fenol: cloroformo con una proporción (1:1), y se invirtieron de 5 a 8 veces para homogenizarlos, después se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm; nuevamente se forman dos fases, con ayuda de una micropipeta se extrae 250  $\mu\text{L}$  de la fase superior, con la precaución de no tomar la fase inferior contaminante, los 250  $\mu\text{L}$  se colocan en un nuevo micro tubo 1,5 mL y se añade 360  $\mu\text{L}$  o 0.6 volúmenes de isopropanol frío, a estas muestras se las mezcla suavemente por inversión de 5 a 8 veces, una vez terminado este proceso se almacena las muestras a -20 °C durante toda una noche o por lo menos 30 minutos, transcurrido este tiempo se centrifuga por 3 minutos a 13000 rpm, se forma un pelet y se elimina todo el líquido por inversión, después se realiza tres lavados con 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % y centrifugación de 3 minutos a 13000 rpm, luego secamos el pelet a 37 °C en un termobloque, finalmente resuspendemos el pelet en 30  $\mu\text{L}$  de TE o  $\text{H}_2\text{O}$  libre ARNasas, las muestras se almacenan a -22 °C.

### **2.3 Electroforesis**

.Este procedimiento fue necesario para determinar la presencia de ADN, durante la electroforesis ocurre un movimiento de moléculas cargadas eléctricamente sobre un gel de agarosa al 1 % sumergido en una solución TBE 1x; al aplicar un campo eléctrico, las

moléculas se mueven a una velocidad dependiente de su carga eléctrica, forma y tamaño, (Bravo, González, y Le Borgne, 2012).

Para realizar lograr visualizar el ADN en el gel de agarosa se utilizó varios reactivos descritos en Anexo 3. El proceso consistió en elaborar 50 mL de gel de Agarosa al 1 % se pesa 0,5 g de Agarosa y se afora a 50 mL con TBE 1<sub>x</sub>, después se coloca la muestra en el microondas durante 60 segundos, una vez homogenizada la muestra, se espera que descienda temperatura a 50 °C o hasta que se pueda poner el recipiente sobre la mano sin quemarse (Bravo et al., 2012); a continuación se adiciona SYBR Safe sustancia que se utiliza para visualizar el ADN en geles de agarosa o acrilamida, ya que actúa como un fluorocromo que puede visualizarse con luz azul o UV en un fotodocumentador (Thermo Fisher Scientific, 2017a). Finalmente disponemos el gel caliente en un molde, sobre el cual se coloca el peine para formar pocillos en el gel cuando se enfría; estos servirán para cargar las muestras de ADN que serán estudiadas, una vez endurecido el gel se coloca dentro de la cámara de electroforesis horizontal, después se añade TBE 1<sub>x</sub> hasta la línea de aforo o hasta cubrir un centímetro sobre el gel (Suárez, Perez, Díaz, & Abraham, 2015).

Para preparar las muestras se toma 5 µL de ADN y 5 µL de tampón de carga (Xilenocianol 25 mg sucrosa 4 g, agua 10 mL) 1<sub>x</sub>, mientras que para productos PCR se toma 4 µL de ADN amplificado y 6 µL de tampón carga, para el marcador molecular Ladder se toma 1,5 µL y 5 µL de tampón de carga. Una vez cargadas las muestras en la cámara de electroforesis se programa la cámara a un voltaje de 90 voltios, durante 40 minutos (Lee, Costumbrado, Hsu, y Kim, 2012).

## 2.4 Amplificación

Con el ADN obtenido se amplificó tres segmentos de los genes *matK*, *rpoB* y *rpoC1*; que son utilizados para identificación a nivel de género y especie (Tallei y Kolondam, 2015), dichos segmentos se los obtuvieron mediante el uso de primers (Tabla 3), que aseguran una sección específica de ADN para su estudio.

Para amplificar el ADN se utilizaron dos protocolos: Phire Plant Direct PCR Master Mix Thermo scientific y Taq Platinum™ Superfi™ PCR Master Mix que trabajaron bajo las mismas condiciones en el termociclador (Tabla 4).

**Tabla 3. Primers para amplificación de regiones de ADN**

Primers	Secuencias (5'>3')	Referencias
<i>matK</i> Forward	ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	(Heckenhauer, Barfuss, y Samuel, 2016)
<i>matK</i> Reverse	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG3	
<i>rpoB1</i> Forward	AAGTGCATTGTTGGAAGTGG	(Moter <i>et al.</i> , 2013)
<i>rpoB1</i> Reverse	CGTATGTGAAAAGAAGTATA	
<i>rpoC1</i> Forward	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	(Kim, Kwon, Kang, Jeon, y Jang, 2012)
<i>rpoC1</i> Reverse	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	

**Fuente:** (Heckenhauer, Barfuss, y Samuel, 2016), (Moter *et al.*, 2013), (Kim, Kwon, Kang, Jeon, y Jang, 2012).

- Phire Plant Direct PCR Master Mix Thermo scientific

Este kit no necesita extracción de ADN previa, primero se tomó una muestra de hoja fresca con la ayuda de un saca bocados (punch) que permite obtener una muestra de 0,5 a 2 mm, la cual se colocó en microtubo de 200 µL, luego se añade 25 µL de Phire plant Direct PCR

Master Mix, 1,25  $\mu\text{L}$  Disolution Buffer, 0,5  $\mu\text{L}$  primer forward (10  $\mu\text{M}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  primer reverse (10  $\mu\text{M}$ ) y finalmente se añade 22,75  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas hasta alcanzar los 50  $\mu\text{L}$ . Es recomendable mantener la cadena de frio, conservando los reactivos y muestras a temperaturas bajas, para evitar la degradación de los reactivos (Thermo Fisher Scientific, 2014)

- Taq Platuinum<sup>TM</sup> Superfi<sup>TM</sup> PCR Master Mix

Para estos productos se colocó en un microtubo de 0,2 mL: 12,5  $\mu\text{L}$  Taq Platuinum<sup>TM</sup> Superfi<sup>TM</sup> PCR Master Mix, después se agrega agua libre de nucleasas 5,5  $\mu\text{L}$ , luego se añade el reactivo Enhanser 5  $\mu\text{L}$ , se añade DMSO (Dimetil sulfóxido) 0,5  $\mu\text{L}$ , a continuación los primers forward y reverse 0,5  $\mu\text{L}$  de cada uno y finalmente 0,5  $\mu\text{L}$  de muestra de ADN previamente extraído de acuerdo con la guía de uso Thermo Fisher Scientific, (2017b).

**Tabla 4. Instrucciones de los ciclos para reacciones de PCR**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Inicio de la Desnaturalización	94	2 min	1
Desnaturalización	94	30 s	33
Annealing	53	30 s	
Extensión	72	40 s	
Final de la Extensión	72	5 min	1
Enfriamiento	4	-	-

**Fuente:** (Kuzmina, 2013)

## 2.5 Secuenciación

La secuenciación de las muestras son preparadas (Anexo 5) y enviadas a Corea del Sur donde son secuenciadas mediante la técnica Sanger en la empresa MACROGEN, este procedimiento nos permitió identificar molecularmente las especies estudiadas

## 2.6 Filogenia

Para determinar la filogenia a nivel molecular de especies del género *Brugmansia* presentes en Ecuador se utilizó los softwares Finch Tv y Mega7, estos permitieron verificar la calidad de las secuencias, así como editar las mismas (Northwest Association for Biomedical Research, 2012). Además se utilizó las herramientas bioinformáticas Boldsystems y Blast, mediante las cuales se analizaron los datos obtenidos, permitiendo verificar la identidad de las especies estudiadas (Boldsystems, 2017). Las regiones estudiadas fueron *matK*, *rpoB* y *rpoCl*; mediante las cuales se construyó el árbol filogenético del género *Brugmansia*.

Al verificar que las secuencias estén óptimas mediante los electroferogramas mostrados por Finch tv, que permiten verificar si las secuencias tienen errores, así como la calidad suficiente para ser utilizadas en la investigación; se procede verificar la identidad de las especies en Blast y Boldsystems, una vez determinado las identidades se utilizó el programa Mega 7 para la edición, alineamiento y construcción del árbol filogenético de las secuencias obtenidas; la alineación de las secuencias se realizaron mediante el algoritmo: MUSCLE, mientras que para la construcción del árbol filogenético de las secuencias alineadas, se utilizó una interfaz NEIGHBOR-JOINING TREE (Hall, 2013).

## Capítulo 3

### Resultados y Discusión

#### 3.1 Colección

Se colectaron 40 muestras de *Brugmansias* en la zona norte de los Andes y en la Amazonia del Ecuador (Tabla 5), se realizó identificación morfológica basándose en la morfología floral de las especies descritas por Hay *et al.*, (2012) (Anexo1).

**Tabla 5. Cantidad de muestras de *Brugmansia* colectadas en diferentes provincias del Ecuador**

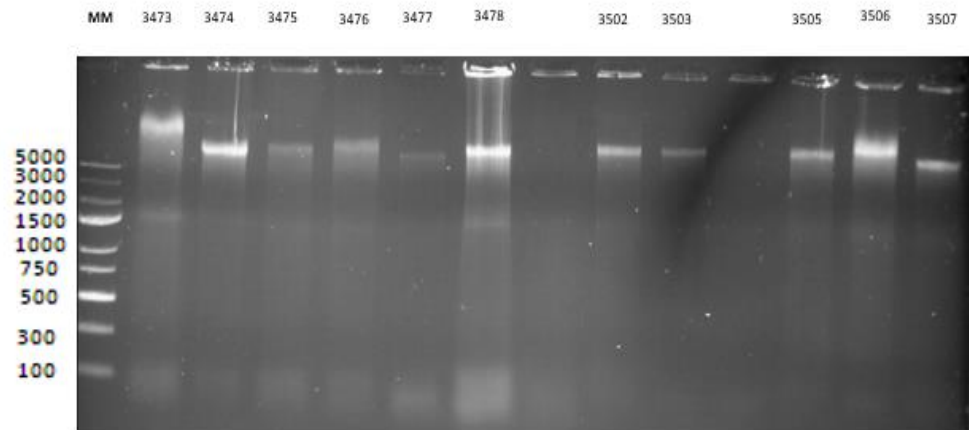
Provincias	Cantidad de muestras colectadas
Carchi	6
Cotopaxi	8
Pichincha	22
Napo	3
Morona Santiago	1
<b>Total</b>	<b>40</b>

**Fuente:** El Autor, 2017

#### 3.2 Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de las 40 muestras recolectadas (Anexo 4), Rawat, Joshi, Annapurna, Arunkumar y Karaba (2016) obtuvieron muestras de ADN mediante la misma técnica utilizada en esta investigación, las muestras de ADN obtenidas se evaluaron mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1 % que fueron revelados en un foto documentador (Figura 2).

### Gel electroforético de extracción de ADN



**Figura 2.** Gel de agarosa al 1% con muestras de ADN de especies del género *Brugmansia*

**Nota:** (MM) Marcador molecular, (3473) *Brugmansia x candida*, (3474) *Brugmansia arborea*, (3475) *Brugmansia* spp, (3476) *Brugmansia arborea*, (3477) *Brugmansia x candida*, (3478) *Brugmansia* spp, (3502) *Brugmansia arborea*, (3503) *Brugmansia arborea*, (3505) *Brugmansia arborea*, (3506) *Brugmansia vulcanicola*, (3507) *Brugmansia* spp.

**Fuente:** El Autor, 2017

Como se observa en la (Figura 2), las bandas de ADN corresponden al tamaño esperado: >5000 pb, con una concentración aproximada de 100-110 ng/  $\mu$ L, este resultado es similar al obtenido por Viana et al. (2015).

### 3.3 Amplificación

Se amplificaron las 40 muestras de ADN en las tres regiones estudiadas, obteniéndose en total 120 productos PCR (Anexo 4).

#### 3.3.1 Región *matK*

Como se muestra en la (Figura 3) se obtuvo bandas de ADN amplificado con un tamaño aproximado de 800 pb, Tallei y Kolondam (2015) en su investigación “DNA Barcoding of Sangahe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using *matK* Gene”, obtuvieron un tamaño de bandas 800 a 889 pb, mostrando concordancia con la presente investigación. La

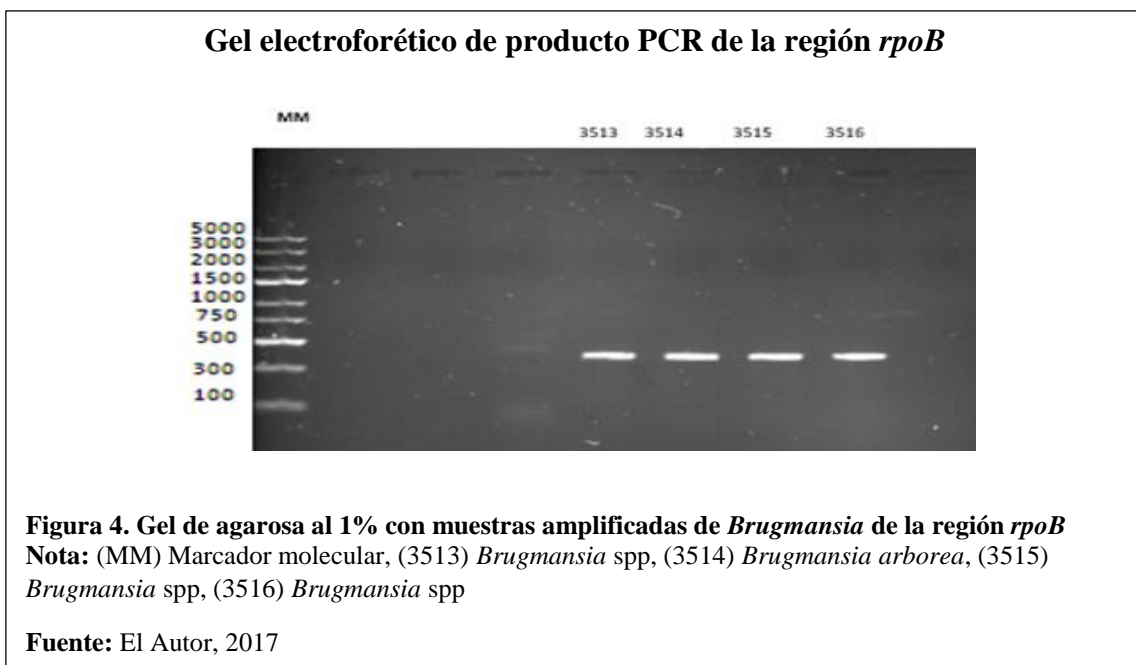


temperatura de hibridación utilizada fue de 53 °C, similar a la ensayada por Topik, Yukawa y Ito (2005).



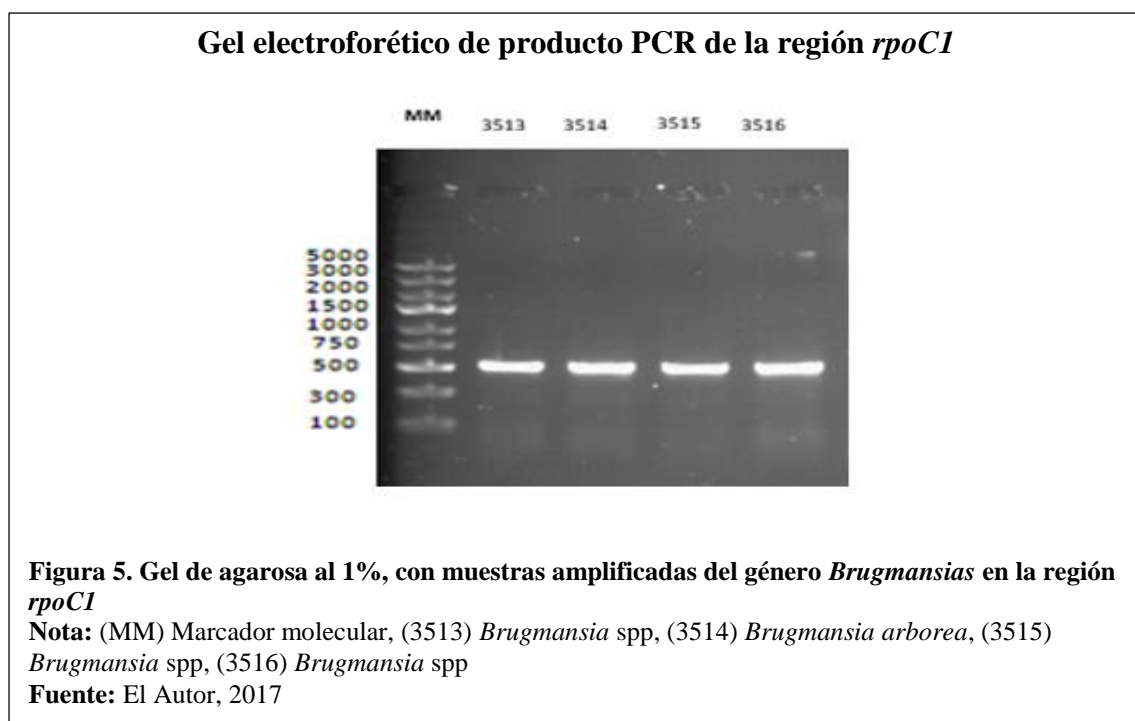
### 3.3.2 Región *rpoB*

Se obtuvo bandas de aproximadamente 400 pb (Figura 4), similar al resultado obtenido en por Horng y otros (2015). Además, se utilizó una temperatura de hibridación de 53 °C similar al trabajo desarrollado por Rusyanthini, Wirajana y Yowani (2015).



### 3.3.3 Región *rpoC1*

Otro gen de estudio fue *rpoC1*, gen cloroplástico utilizado en estudios de poblaciones, los resultados para este gen fueron de 550 pb aproximadamente (Figura 5), visibles en la electroforesis realizada, por su parte Kim y otros (2012), encontraron valores entre 500 a 600 pb, resultados similares a los encontrados en la presente investigación. La temperatura de hibridación utilizada para esta amplificación fue de 53 °C, temperatura también utilizada por Al-Qurainy, Khan, Nadeem, Tarroum y Al-Ameri (2014) con la región *rpoC1*.



### 3.4 Secuenciación Sanger

Los productos amplificados fueron secuenciados con la técnica sanger en la empresa Macrogen (Figura 6), Se obtuvieron 120 secuencias de los genes *matK*, *rpoB* y *rpoC1* en formato fasta. Con estas secuencias se identificó las especies a las que pertenecen las muestras colectadas mediante las herramientas bioinformáticas: Blast y Boldsystems, que

comparan nuestros resultados con la base de datos GenBank y NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se obtuvo una identidad del 100 % y un Query Cover (QC) de 99 % con el marcador molecular *matK*, este identificó las siguientes especies: *Brugmansia suaveolens*, *Brugmansia x candida*, *Brugmansia sanguinea*, *Brugmansia arborea* (Anexo 5y 6). Estos resultados aseguran la identidad de las especies en estudio.

Query		Subject					Identities			QC		
Name	Length	Gene	Ref.	Length	Start	End	Match	Total	Pct (%)	Match	Total	Pct
3476Matk	831	[Brugmansia arborea]	<a href="http://">http://</a>	243	13	243	198	199	99	199	199	93
3363Matk	852	[Brugmansia sanguinea]	<a href="http://">http://</a>	505	181	435	255	255	100	255	255	99
3365Matk	846	[Brugmansia suaveolens]	<a href="http://">http://</a>	262	6	262	257	257	100	257	257	99
3516Matk	839	[Brugmansia x candida]	<a href="http://">http://</a>	262	11	262	252	252	100	252	252	99
3367Matk	910	[Brugmansia x candida]	<a href="http://">http://</a>	509	177	440	262	264	100	263	264	99

**Figura 6. Resultados generados por Blast, GenBank**

**Nota:** Query (Consulta), Subjetc (Sujeto), Identities (Identidades), Query Cover (Cobertura de consulta), Name (Nombre), Length (longitud), Ref (referencia), Gene (Gen), Start (Comienzo), End (Final), Pct (Porcentaje), Match (Emparejamiento)

**Fuente:** Editado de MacroGen 2017 por El Autor 2017

Como se observa en la Figura 7, las secuencias obtenidas en formato fasta e ingresadas en Blastn dan como resultado el porcentaje de QC e Identidad correspondientes a cada secuencia. Las demás especies del género *Brugmansia* presentes en Ecuador no están registradas en GenBank por lo cual no se pueden comparar las secuencias y los resultados arrojados por Blast llegan a 99 % QC y 99 % de identidad o porcentajes menores, debido a que son especies diferentes por lo que es necesario construir un árbol filogenético con el fin de diferenciar unas especies de otras mediante la formación de clados. Está investigación puede aportar con las secuencias de las especies faltantes.

## Alineamiento en Blast

Description	Max score	Total score	Query cover	E value
<a href="#">Brugmansia arborea voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds, chloroplast</a>	1221	1221	100%	0.0
<a href="#">Brugmansia x candida isolate R048 IRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence, and maturase K (matK) gene, complete cds, chloroplast</a>	1216	1216	100%	0.0

Brugmansia arborea voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds, chloroplast  
 Sequence ID: [JN244343.1](#) Length: 731 Number of Matches: 1  
[► See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 10 to 670 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1221 bits(661)	0.0	661/661(100%)	0/661(0%)	Plus/Plus

### Secuencia:

```

TTTACATTTATTACGATTCTTTCTCCACGAATATTGGAATTTGAATAGTCTTATTACTTCA
AAGAAGCCCGGTTACTCCTTTTCCAAAAAAATCAAAGATTCTTCTTCTTCTTATATAATT
CTTATGTATATGAATGCGAATCCACTTTCGTCTTTCTACGGAACCAATCTTCTCATTAGG
ATCAACATCTTTTAGAGCCCTTCTTGAACGAATATATTTCTATGGAAAAATAGAACGTCT
TGTAGAAGTCTTTGCTAAGGATTTTCAGGTTACCCTATGGTTATTCAAGGATCCTTTTCATG
CATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCAAAGGGACGTTCTTTTATG
AATAAATGGAAATTTTACCTTGTCAATTTTTGGCAATGTCATTTTTCTCTGTGCTTTCACA
TAGGAAGGATCCATATAAACCAATTATCCAACCATTCCCGTGACTTTATGGGCTATCTTT
CAAGTGTGCGACTAAATCATTCAATGGTACGTAGTCAAATGTTCGAAAATTCATTTCTAA
TCAATAATGCAATTAAGAAGTTCGATACCCTTGTTCGAATTATTCCTTTGATTGGATCATT
AGCTAAAGCAAACCTTTTGTACCGTATTAGGGCATCCCATTAGTAAACCGGTGTGG
  
```

**Figura 7.** Descripción de la secuencia de *Brugmansia arborea*

**Fuente:** El Autor, 2017

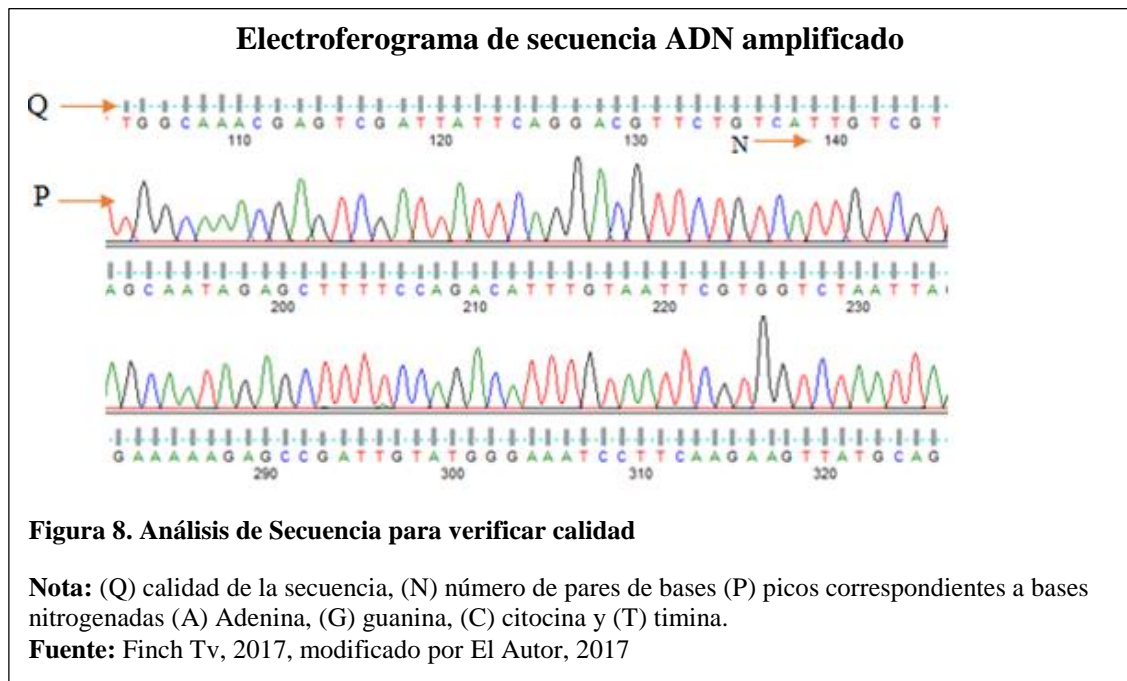
### 3.5 Análisis Bioinformático

Se analizaron 120 secuencias en el programa Finch Tv, de las cuales 100 secuencias (83,3 %) tuvieron una calidad aceptable, esto visible mediante electroferogramas (Figura 8) donde se pueden apreciar los picos de bases nitrogenadas presentes en las secuencias, con valores que superan la media aceptable, como lo sugiere la técnica descrita por (Sol-Church & Frenck, 2015).

Para el marcador *rpoB*: se obtuvieron 38 secuencias (95 %) con calidad aceptable, para el marcador *rpoC1* 37 secuencias (92,5 %) secuencias con calidad aceptable y con *matK* 25

secuencias (62,5 %) con calidad aceptable; el marcador *rpoB* mostró mayor eficiencia en la calidad de secuencias, posiblemente porque son secuencias de tamaño corto (Anexo 8).

Han *et al.*, (2011), mencionan que es necesario verificar si las secuencias son fiables para poder realizar análisis bioinformáticos, especialmente estudios filogenéticos, debido a que las deleciones o inserciones en regiones intergénicas podrían causar brechas en las secuencias, aumentando las distancias intra e inter específicas de los genes en estudios, causando el agrupamiento de individuos en clados erróneos.



### 3.5.1 Alineamiento

Para alinear las secuencias se utilizó el software Mega 7; a través del algoritmo MUSCLE, que nos permite desarrollar alineamientos múltiples de las secuencias, un investigación similar desarrollada con el gen *matK* por Tallei y Kolondam (2015) denominado “Código de barras de ADN de Sangihe Nutmeg (*Myristica fragrans*) usando el gen *matK*”. En esta investigación para el estudio del gen *matK* se desarrolló el alineamiento de 25 secuencias

de las especies colectadas junto con 6 secuencias descargadas de GenBank de las especies *Brugmansia arborea*, *B. sanguinea*, *B. suaveolens*, *B. x candida*, *Cestrum nocturnum* y *Datura stramonium*. Para el análisis de la región *rpoB* se alinearon 25 secuencias y se incluyeron secuencias de *Datura stramonium* y *Datura inoxia* tomadas de GenBank (Anexo 9). En el ensayo realizado con la región *rpoC1* se alineó 25 secuencias de este trabajo junto con la secuencia de *Nicotina noctiflora* obtenida de GenBank. Las especies que no pertenecen al género *Brugmansia* fueron utilizadas como especies externas ya que pertenecen también a la familia Solanaceae, estas especies externas pertenecen a un grupo cercano para evitar la formación de ramas largas en el árbol filogenético como lo recomienda Valcárcel (2007). Finalmente se alinearon secuencias concatenadas de las regiones *matK*, *rpoB* y *rpoC1* junto con *Datura stramonium* y *Cestrum nocturnum* (grupo externo) secuencias descargadas de GenBank y usadas como grupo externo, las secuencias concatenadas muestran mayor precisión en la filogenia que el uso de alineamientos individuales (Gadagkar, Rosenberg, & Kumar, 2005).

Comenzando con 25 secuencias de *matK* con tamaño de 800 pb descrita por Tallei y Kolondam (2015), se realizó el alineamiento y edición las secuencias reduciendo los extremos de las secuencias y obteniéndose una secuencia final de 655 pb de tamaño, encontrándose 12 lugares no homólogos dando una variabilidad del 1.83 % para este gen. Según Susann & Quandt, (2009) el gen *matK* es usado para filogenia porque muestra mayor grado de evolución con respecto a otros genes.

Con respecto al marcador *rpoC1* se alinearon 25 secuencias con un tamaño de 453 pb, diferenciándose en 7 nucleótidos, lo que representa una variación de 1.54 %. En otros estudios con el gen *rpoC1* se demuestra que el gen puede ser altamente conservado sin

embargo posee una variación en ciertas partes del gen que permiten formar árboles filogenéticos (Wilson, Schembri, Baker, y Saint, 2000).

Para el marcador *rpoB* se alinearon 25 secuencias con un tamaño de 289 pb encontrándose 4 nucleótidos diferentes es decir una variación del 1,38 %: *rpoB* es el gen de menor tamaño y con menor número de lugares no homólogos por lo que se concluye que es el gen más conservado. Otro estudio con el gen *rpoB* descrito por Vijayan y Tsou (2011) muestra regiones conservadas en el gen *rpoB* que permiten identificar algunas bacterias y plantas que poseen este gen.

### **3.6 Filogenia**

Se construyeron 3 árboles filogenéticos para cada región estudiada y 1 un árbol con secuencias concatenadas, se utilizó el software Mega7 mediante el método *Neighbor-Joining Tree* dando los siguientes resultados:

#### **3.6.1 Región *matK***

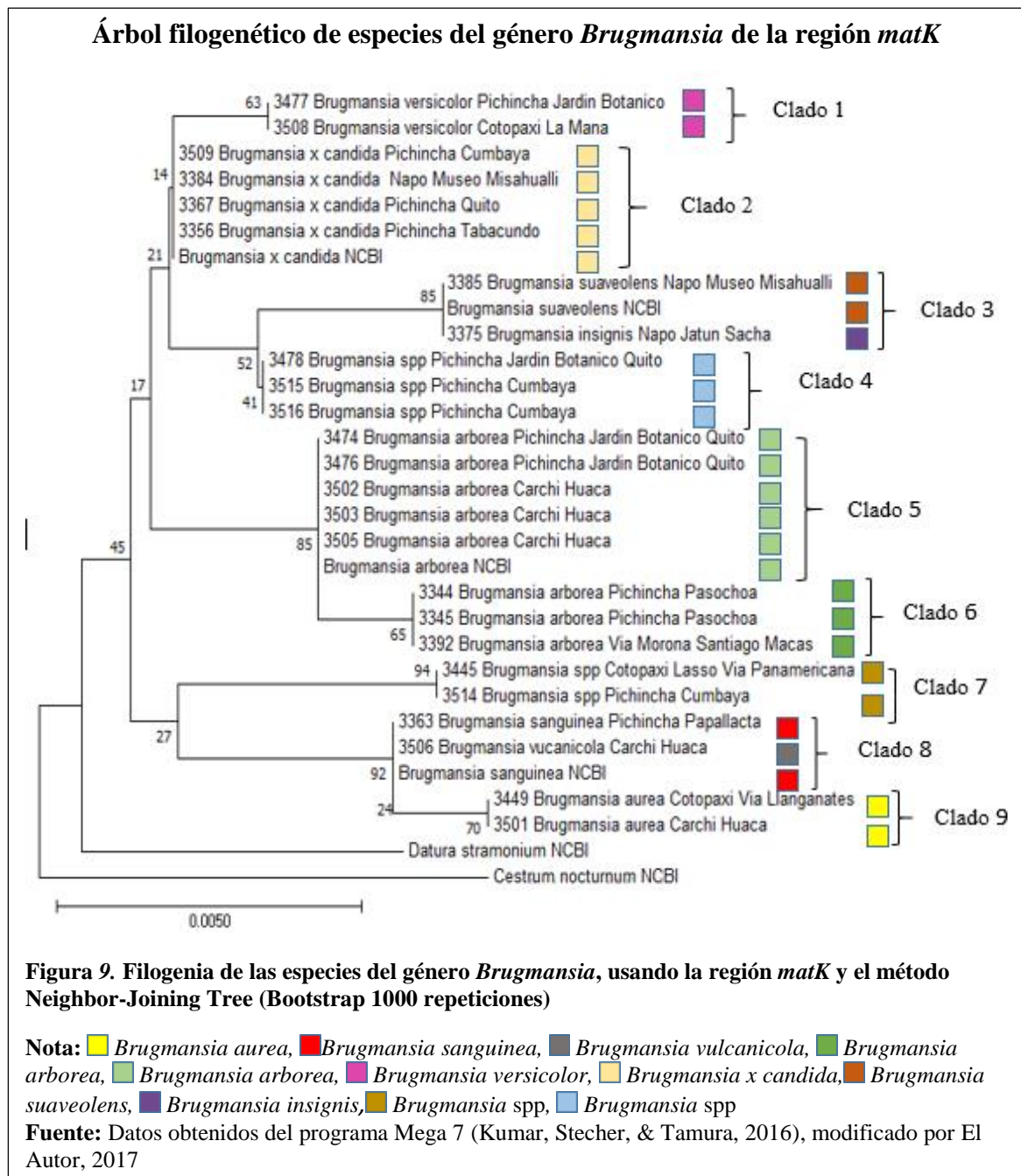
Como se observa en la Figura 9 el árbol filogenético desarrollado con el segmento *matK* muestra 9 grupos del género *Brugmansia* junto con las 2 especies utilizadas como grupos externos (outgrup), este proceso se realizó con Bootstrap de 1000 repeticiones como lo presenta Penjor *et al.* (2013) en su investigación “Relaciones filogenéticas de *Citrus* y sus parientes basados en secuencias del gen *matK*”.

Existen 15 valores estadísticos en cada rama del árbol formado de las cuales 8 superan el 50 % de soporte de rama que asegura la verosimilitud en la formación de los clados; las que tienen menor porcentaje, muestran la distancia entre grupos (Soltis y Soltis, 2003). En este árbol se presentan 9 clados: Clado 1 formado por dos individuos de *B. versicolor*, el

clado 2 está formado por 4 individuos de *B. x candida*, está junto al clado 1 ya que *B. x candida* es un híbrido entre *B. insignis* y *B. aurea* (Hay *et al.*, 2012). El clado 3 agrupa a *B. suaveolens* y *B. insignis* ambas predominantes en la zona amazónica del Ecuador (Tropicos, 2017). El clado 4 reúne a individuos híbridos, que por la ubicación en el árbol filogenético podría tratarse de *Brugmansia. x cubensis*, es decir un híbrido entre *B. insignis*, *B. suaveolens* y *B. aurea*, planta híbrida descrita por Preissel y Preissel (2002). El clado 5 y 6 tiene individuos de la especie *B. arborea*, la diferencia entre ambos clados puede referirse que el clado 6 podría tratarse de una variedad de *B. arborea* o de algunas especies híbridas con *B. arborea*, ya que estas especies se pueden coleccionar a las alturas diferentes y el tamaño de la flor puede variar (Hay *et al.*, 2012). El clado 7 posee dos individuos híbridos que podrían ser el resultado de la cruce de *B. arborea* y *B. sanguinea* a esta especie se le denomina *Brugmansia x flava* descrita por Preissel y Preissel (2002). El clado 8 está formado por *B. sanguinea* y *B. vulcanicola*, estas especies son de clima frío y están ligadas entre sí, pero tienen diferencias morfológicas que las distinguen, como la forma de la flor y su coloración distintiva siendo completamente roja o rosada para *B. vulcanicola*, mientras que *B. sanguinea* presenta coloración roja combinada con amarillo y naranja. (Hay *et al.*, 2012). Por último el clado 9 está formado por dos individuos de *B. aurea* también considerada de clima frío y ligada a *B. sanguinea*, esto se demuestra en la filogenia de la familia Solanaceae elaborada por Olmstead y *otros* (2008). Finalmente, *Datura stramonium* y *Cestrum nocturnum* pertenecientes a la familia Solanaceae son especies utilizadas como grupos externos que muestran que los géneros *Datura* y *Cestrum* comparten un ancestro común con el género *Brugmansia*. En los clados 2,3,5 y 8 encontramos secuencias descargadas de la página web NCBI, mismas que aseguran que



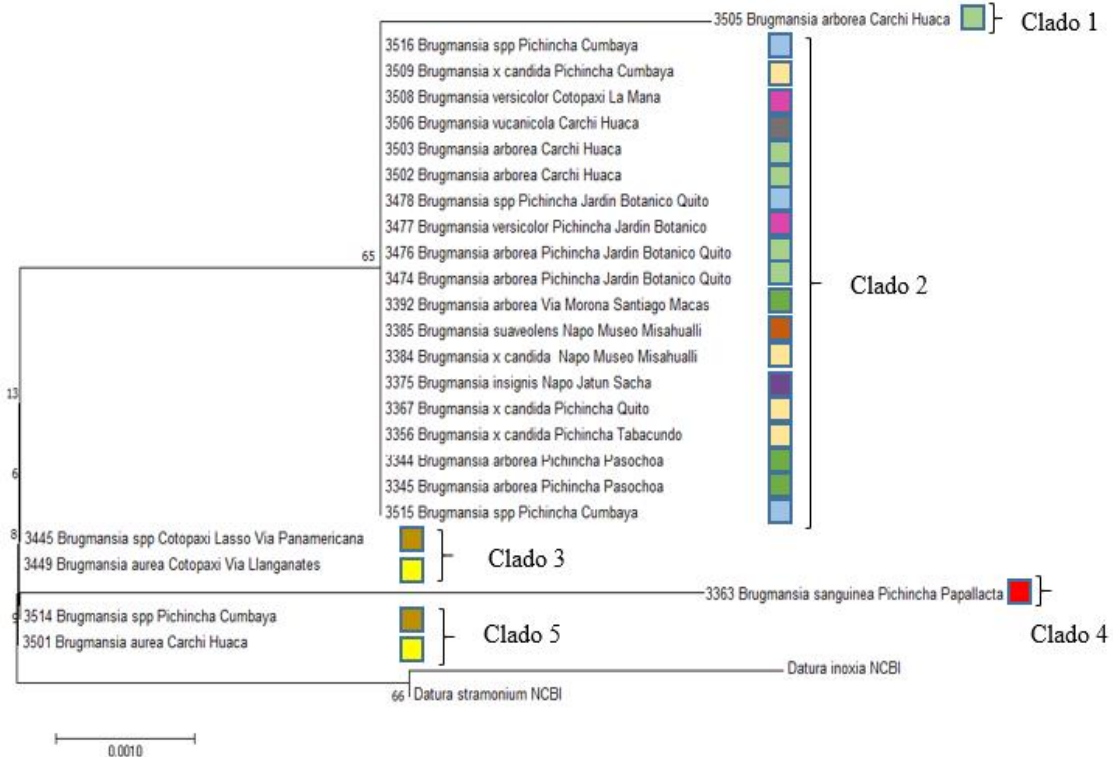
las especies estudiadas correspondan a las subidas a esta plataforma virtual, dando confiabilidad a este estudio.



### 3.6.2 Región *rpoB*

Como se muestra en la Figura 10, para la región *rpoB* el árbol filogenético tiene 5 clados, como los soportes de rama son bajos se puede tomar a *B. aurea*, *Brugmansia* spp y *B. sanguinea* en un solo grupo, mientras que *B. x candida*, *B. suaveolens*, *B. versicolor*, *B. vulcanicola*, y *B. insignis* en otro grupo; es decir 7 especies en dos grupos, muestra de la alta conservación del gen; a cada especie se le asignó un color de forma similar a los usados en el árbol filogenético de la región *matK*. No existen secuencias de la región *rpoB* del género *Brugmansia* en la base de datos NCBI; para el primer clado tenemos un solo individuo correspondiente a la especie *B. arborea*, en el segundo clado tenemos agrupados a la mayor cantidad de individuos (19 ejemplares) pertenecientes a *B. x cubensis*, *B. x candida*, *B. vulcanicola*, *B. versicolor*, *B. arborea*, *B. suaveolens* y *B. insignis*, en el tercer y quinto clado tenemos 2 especies *B. aurea* y *B. x flava*, mientras que para el cuarto clado existe una especie que es *B. sanguinea*, finalmente tenemos dos secuencias como grupos externos de las especies *Datura inoxia* y *Datura stramonium* que muestran la diferencia que hay entre ambos géneros en la región *RpoB*. En otras investigaciones de filogenia con el gen *rpoB* mediante el método Neighbor-Joinin Tree también se utiliza Bootstrap con 1000 repeticiones como lo señalan Ferreira, Rodrigues, Harakava, y Lanza (2012). El menor número de clados en la región *rpoB* se debe a que esta región posee una cadena corta con menor diferencia entre nucleótidos, es decir altamente conservados en el gen *rpoB*, tomando en cuenta los resultados anteriores con la poca variabilidad de nucleótidos en las 25 secuencias estudiadas se concluye que es una región es altamente conservada y que no diferencia con precisión una especie de otra en esta región (Case *et al.*, 2007).

### Árbol filogenético de especies del género *Brugmansia* de la región *rpoB*



**Figura 10. Filogenia de las especies del género *Brugmansia*, usando la región *rpoB* y el método Neighbor-Joining Tree (Bootstrap 1000 repeticiones)**

**Nota:** ■ *Brugmansia aurea*, ■ *Brugmansia sanguinea*, ■ *Brugmansia vulcanicola*, ■ *Brugmansia arborea*, ■ *Brugmansia arborea*, ■ *Brugmansia versicolor*, ■ *Brugmansia x candida*, ■ *Brugmansia suaveolens*, ■ *Brugmansia insignis*, ■ *Brugmansia* spp, ■ *Brugmansia* spp

**Fuente:** Datos obtenidos del programa Mega 7 (Kumar et al., 2016), modificado por El Autor, 2017

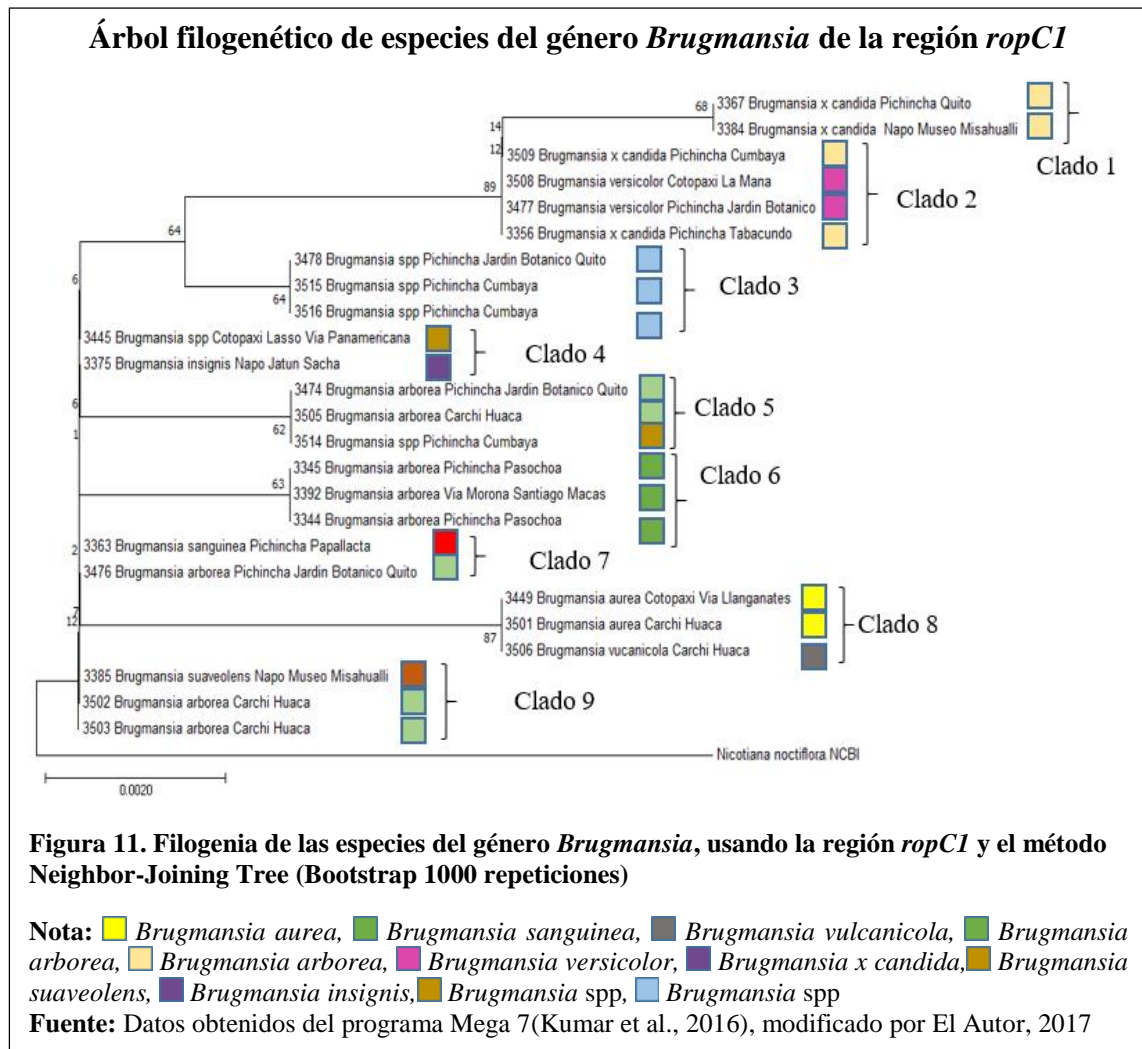
### 3.6.3 Región *rpoC1*

Al igual que en el árbol filogenético elaborado con la región *matK*, el árbol para la región *rpoC1* presenta 9 grupos pero no los agrupa de manera similar que en la región *matK*, tomando como referencia que la región *rpoC1* no presenta el mismo tamaño que la región *matK* y que no existen secuencias de *rpoC1* de especies del género *Brugmansia* en las plataformas bioinformáticas; para su clasificación se obtuvo: el clado1 incluye a dos individuos de *B. x candida*, el clado 2 presenta 2 individuos de *B. x candida* y 2 individuos de *B. versicolor*, en el clado 3 encontramos 3 individuos de *B. x cubensis*, en el clado 4

aparecen 2 especies *B. insignis* y *B. x flava*, en el clado 5 encontramos 2 especies *B. arborea* y una especie de *B. x flava*, en el clado 6 hallamos 3 individuos de *B. arborea*, mientras que en el clado 7 se puede observar una especie de *B. sanguinea* y una especie de *B. arborea*, en el clado 8 apreciamos 2 especímenes de *B. aurea* y un individuo de *B. vulcanicola*, en el clado 9 encontramos 2 especies: *B. arborea* y *B. suaveolens*, finalmente se puede observar a *Nicotina noctiflora* como grupo externo, perteneciente a la familia Solanaceae. Investigadores como Shibl, Haroon, Ngugi, Thompson y Stingl (2016) muestran la filogenia mediante Neighbor-Joining Tree con un Bootstrap de 1000 repeticiones en su investigación “Distribución de Ecotipos de *Prochlorococcus* en la cuenca del Mar Rojo basada en análisis de secuencias de *rpoCI*”.

Los clados 1 y 2 están directamente relacionados ya que ambos poseen especímenes de *B. x candida* que es un híbrido de *B. versicolor* (presente en clado 2) y *B. aurea* estudiados por Hay y otros (2012). El clado 3 agrupa a *Brugmansias híbridas* estas podrían tratarse de *Brugmansia x cubensis* descritas por Preissel y Preissel (2002), el clado 4 muestra un individuo de *B. insignis* y una *B. híbrida* que podría tratarse de *B. x flava*, el clado 5 muestra 2 individuos de *B. arborea* y un *Brugmansia híbrida* por lo que este clado podría tratarse de una variedad de *B. arborea* o todos los individuos de este clado con híbridos, los clados 6 y 7 están muy relacionados ya que estos poseen especies de *B. arborea*, *B. sanguinea* y *B. x flava* que es un híbrido entre *B. arborea* y *B. sanguinea* mencionada por Preissel y Preissel (2002), el clado 8 muestra a individuos de *B. aurea* y *B. vulcanicola* ambas de clima frío y relacionadas entre sí también en la región *matK*, finalmente el clado 9 presenta a *B. arborea* y a *B. suaveolens*, que no tiene una aparente relación pero evidencia la diferencia entre *B. suaveolens* con *B. insignis* que están presentes en la región

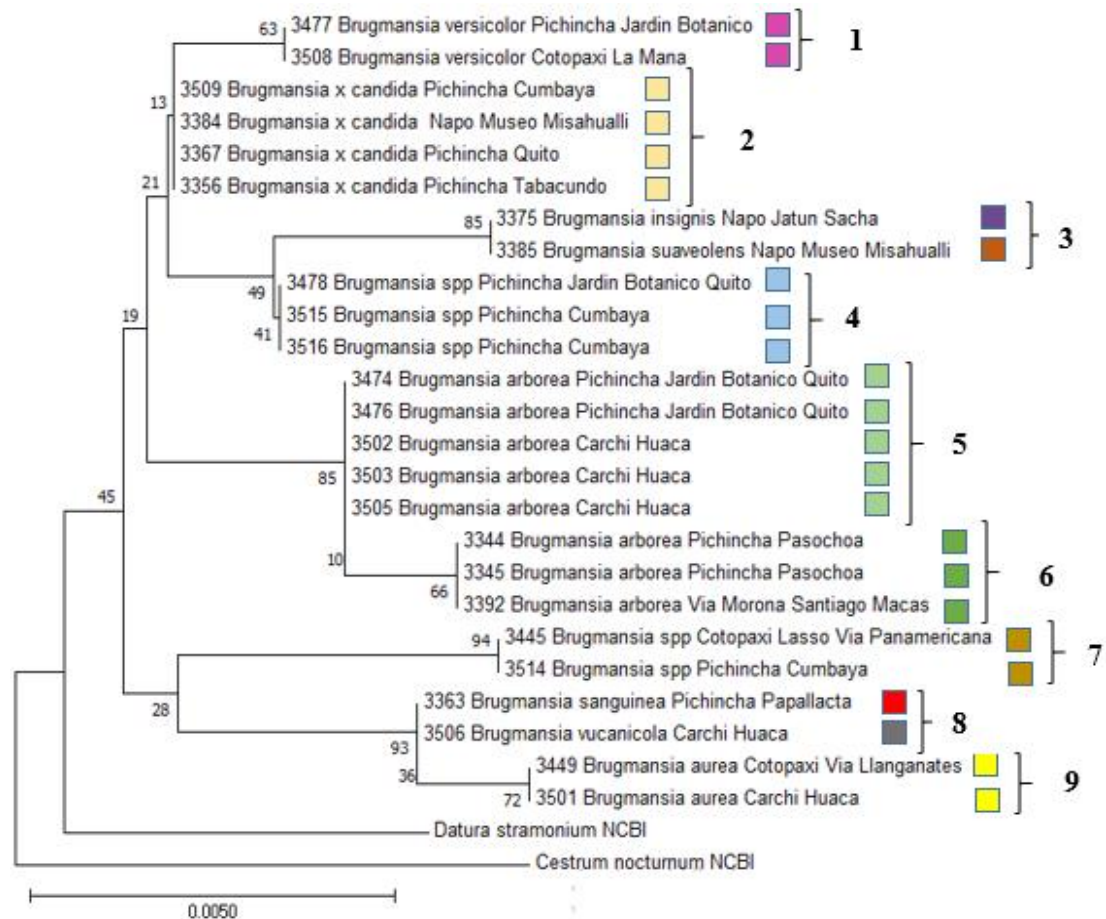
amazónica ecuatoriana y se agrupan en el mismo clado en la región *matK*. Finalmente, como grupo externo para esta región se utilizó la secuencia correspondiente a *Nicotiana noctiflora* descargada de la plataforma virtual NCBI.



### 3.6.4 Regiones concatenadas

Para complementar esta información se realizó un árbol filogenético uniendo las tres regiones *matK*, *rpoB* y *rpoC1* en un solo árbol filogenético.

**Árbol filogenético de especies del género *Brugmansia* usando las regiones *matK*, *rpoB* *ropC1***



**Figura 12. . Filogenia de las especies del género *Brugmansia* usando las regiones *matK*, *rpoB* y *ropC1* mediante el método Neighbor-Joining Tree (Bootstrap 1000 repeticiones).**

**Nota:** ■ *Brugmansia aurea*, ■ *Brugmansia sanguinea*, ■ *Brugmansia vulcanicola*, ■ *Brugmansia arborea*, ■ *Brugmansia arborea*, ■ *Brugmansia versicolor*, ■ *Brugmansia x candida*, ■ *Brugmansia suaveolens*, ■ *Brugmansia insignis*, ■ *Brugmansia* spp, ■ *Brugmansia* spp

**Fuente:** Datos obtenidos del programa Mega 7 (Kumar et al., 2016), modificado por El Autor 2017

El resultado del árbol filogenético con las tres regiones *matK*, *rpoB*, *ropC1* concatenadas fueron 9 clados: Clado 1 formado por *B. versicolor*, clado 2 está formado *B. x candida*, Clado 3 agrupa a *B. suaveolens* y *B. insignis*, el clado 4 reúne a tres individuos híbridos: *B. x cubensis*, híbrido entre *B. insignis*, *B. suaveolens* y *B. aurea*, el clado 5 tiene especímenes de *B. arborea*, el clado 6 posee especímenes que pueden ser variedad de *B. arborea* o especies híbridas, el clado 7 posee 2 individuos híbridos de *B. x flava* producto

del cruzamiento entre *B. arborea* y *B. sanguinea*, el clado 8 está formado por *B. sanguinea* y *B. vulcanicola*, el clado 9 está formado por individuos de *B. aurea*, finalmente encontramos a *Datura stramonium* y *Cestrum nocturnum* especies pertenecientes a la familia Solanaceae, que fueron utilizados como grupos externos.

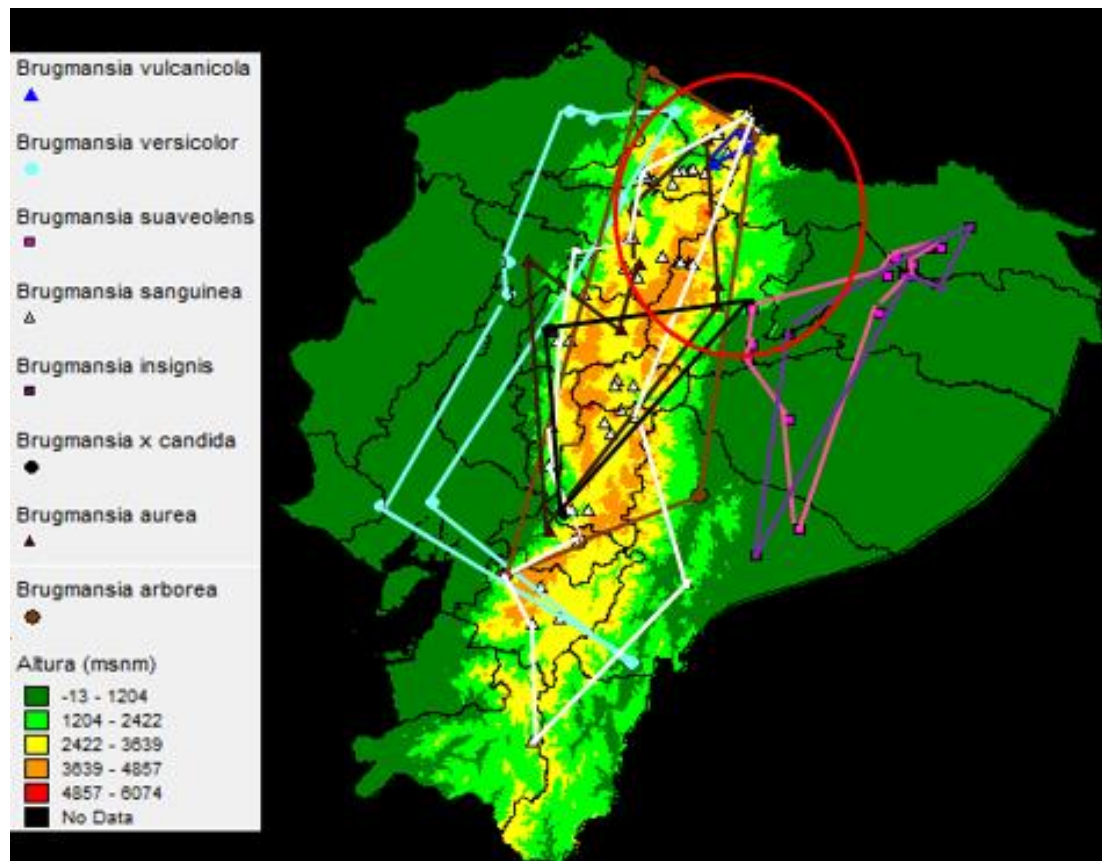
Al combinar las tres regiones en un solo árbol filogenético (Figura 12), se puede apreciar que tiene la misma clasificación que la región *matK*, la cual posee mayor número de pares de bases, confirmando que todas las especies estudiadas están agrupadas en clados correctos. La filogenia de secuencias concatenadas con varios genes produce árboles más precisos, incluso cuando estas secuencias concatenadas han evolucionado con patrones de sustitución muy diferentes como lo explica Gadagkar, Rosenberg, y Kumar (2005). Otros estudios de filogenia que utilizaron los genes *rpoB* y *rpoC1* combinados fueron usados para armar árboles filogenéticos entre los géneros *Hexachlamys* y *Eugenia* estudiado por Da Cruz y otros (2013).

### **3.7 Distribución**

La distribución de las especies del género *Brugmansia* fue analizada con el software DIVA GIS, dicha información mostró ocho zonas de distribución en un mapa del Ecuador (Figura 13), permitiendo relacionar estas zonas con los resultados obtenidos en estudio molecular.



### Distribución de especies del género *Brugmansia* presentes en Ecuador



**Figura 13. Puntos geográficos de especies del género *Brugmansia* presentes en Ecuador**

**Nota:** Los puntos geográficos fueron obtenidos de la página web Tropicos, 2017

La zona de diversificación de las especies de *Brugmansia* está contenida dentro de la circunferencia de color rojo

**Fuente:** Obtenido de Diva Gis 2017, modificado por El Autor, 2017

En la Figura 13 se puede observar las zonas de distribución de las especies del género *Brugmansia*; en el mapa se distingue varios polígonos de diferente color que señalan el territorio en el que se extiende cada especie, pudiendo ubicar la zona de especiación del género *Brugmansia* en los puntos de convergencia de los polígonos: la especie *Brugmansia sanguinea* se ubican en toda la sierra ecuatoriana limitada por las estribaciones de La cordillera de los Andes, por lo que se considera que esta especie ha desarrollado una especiación alopátrica descrita por Boucher, Zimmermann y Conti



(2016). En cuanto a *Brugmansia vulcanicola* se localiza en la zona norte de los Andes, específicamente en la provincia del Carchi, también se la puede encontrar en el país vecino Colombia en el valle de Cauca según Hay *et al.*, (2012). La especiación peripátrica descrita por García, (2013); se evidencia en *B. vulcanicola* ya que se aísla geográficamente de un grupo de mayor extensión territorial como es *B. sanguinea*, que se encuentra en toda la sierra, mientras que *B. vulcanicola* solo en la provincia del Carchi. Estas dos especies también están relacionadas en la filogenia elaborada en esta investigación y comparten un clado como se muestra en las (Figuras 9 y 12). Para especies de *B. insignis* y *B. suaveolens* también están aisladas geográficamente en la Amazonía del Ecuador, éstas poseen una especiación simpátrica referida anteriormente por Saldamando (2010), ya que evolucionaron de manera independiente en un mismo espacio geográfico, ambas comparten un ancestro común que puede ser *B. arborea*, esto también se puede evidenciar en el árbol filogenético elaborado en esta investigación (Figuras 9, 10 y 12). En cuanto a *B. aurea* esta se encuentra distribuida en la parte centro-norte de la sierra compartiendo el mismo espacio que *B. sanguinea*, pero ambas especies presentan características diferentes por lo que se considera una especiación simpátrica, además se encuentra juntas en los clados formados en la filogenia del género (Figuras 9,10,11 y 12). La especie *B. arborea* se localizada bordeando la Cordillera de los Andes, por lo que posee una especiación parapátrica descrita por Teerawarunyoo *et al.*, (2017); es decir que podría desarrollarse tanto a la zona costera, amazónica y en los Andes; demostrando que puede extenderse sobre la barrera geográfica de la cordillera. *B. arborea* aparece en dos clados diferentes correspondiente a individuos colectados en distintas provincias, pudiendo ser especies híbridas (Figuras 10, 12 y 13). Por otro lado, *B. versicolor* se ubica en la región costa, presenta una especiación alopátrica; esta especie se encuentra en un clado compartido con

*B. x candida*, especie híbrida de *B. versicolor* como se muestra en las (Figuras 10, 11, 12 y 13). Finalmente, *B. x candida* al ser un híbrido cultivado no se la puede encontrar de forma silvestre, su distribución dependerá de los sitios en la que sea cultivada. En el presente estudio se encontró que la mayoría de muestras colectas fueron halladas en jardines o colecciones privadas, lo que nos muestra el grado de domesticación que se le ha dado a este género, dando paso a la formación de híbridos y cultivos para uso ornamental. Como lo menciona Palacios (2010), las especies del género *Brugmansia* están relacionadas a los asentamientos humanos y es muy rara o ausente en bosques naturales.

Se puede observar que los árboles filogenéticos elaborados en esta investigación concuerdan con la distribución de las especies descritas por otros investigadores, dando validez a los resultados obtenidos y aportando con secuencias de este género a las plataformas virtuales bioinformáticas.

## Conclusiones

- Se colectaron cuarenta especímenes de *Brugmansias* presentes en cinco provincias de Ecuador, mismas que fueron utilizadas para elaborar muestras de herbario y para obtener registros de ADN; solo 2 de las muestras se encontraron en estado silvestre las demás en cultivos privados, mostrando el grado de domesticación del género *Brugmansia*.
- Mediante los métodos Doyle & Doyle modificado y Phire Plant Direct PCR Master Mix se pudo obtener ADN total de todas las muestras colectadas del género *Brugmansia*, probando la efectividad de dichos métodos sobre todo al usar muestras frescas, pero al utilizar muestras secas no se pudo obtener ADN amplificable, especialmente por la fenolización de muestras.
- Mediante la técnica PCR convencional se logró amplificar las regiones *matK*, *rpoB* y *rpoC1* de todas las muestras de ADN obtenidas, siendo la región *matK* la más útil para la identificación y construcción del árbol filogenético del género, debido a que es la región de mayor tamaño, mostró mayor número de diferencias al comparar entre especies que permitieron elaborar un árbol filogenético completo.
- Se pudo identificar cuatro muestras de las siete presentes en Ecuador mediante el uso de las herramientas bioinformáticas BLAST y BOLDSYSTEMS, a través del uso de la región *matK*, estas fueron: *Brugmansia sanguinea*, *Brugmansia arborea*, *Brugmansia suaveolens* y una especie híbrida denominada *Brugmansia x candida*. Las secuencias de las demás especies no se encuentran almacenadas en las bases de datos de GenBank.

- El árbol filogenético elaborado con las secuencias concatenadas de *matK*, *rpoB*, *rpoC1* y *matK* solo, permitieron establecer el mayor número de clados coherentes con la identificación morfológica y la distribución geográfica del género en Ecuador.
- El mapa de la distribución del género *Brugmansia* muestra los límites de localización de cada especie y establece a la zona nor oriental de los Andes ecuatorianos como el punto de diversificación de las especies de este género, además muestra como las barreras geográficas, el clima y la altura se relacionan con la especiación de individuos.

### **Recomendaciones**

- Recolectar las especies durante la etapa de floración para poder identificarlas morfológicamente
- Utilizar muestras frescas en la extracción de ADN ya que provocan menos fenolización y degradación de ADN.
- Determinar la temperatura de Annealing correcta durante la amplificación para evitar la formación de bandas dobles o subproductos.
- Analizar todo el genoma de las especies para tener una identificación molecular completa.
- Realizar un análisis proteómico para determinar proteínas responsables de producir metabolitos secundarios de importancia farmacéutica como la escopolamina, hioscina y hiosciamina.
- Desarrollar programas de reforestación con esta especie ya que su nivel de domesticación es alto y es difícil encontrarlas de forma silvestre.

## Bibliografía

- Al-Qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M., Tarroum, M., & Al-Ameri, A. (2014). Selection of DNA barcoding loci and phylogenetic study of a medicinal and endemic plant, *Plectranthus asirensis* J.R.I. wood from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 6184–6190. <https://doi.org/10.4238/2014.August.7.31>
- Álvarez, L. (2008). Borrachero, cacao sabanero o floripondio (*Brugmansia* spp.) un grupo de plantas por redescubrir en la biodiversidad latinoamericana. *Revista Cultura Y Droga*, 77–93. Retrieved from [http://200.21.104.25/culturaydroga/downloads/culturaydroga13\(15\)\\_6.pdf](http://200.21.104.25/culturaydroga/downloads/culturaydroga13(15)_6.pdf)
- American Society of Health System Pharmacists, & McEvoy, G. (2008). *Brugmansia*. *AHFS Drug Information*, 1298–1323. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/ahfs-drug-information-2008/oclc/213489103>
- Anthony, S., Zuchowski, W., & Setzer, W. (2009). Composition of the Floral Essential Oil of *Brugmansia suaveolens*. *Records of Natural Products Journal Impact*, 76–81. Retrieved from [http://acgpubs.org/RNP/2009/Volume 3/Issue 1/9\\_RNP-0812-62.pdf](http://acgpubs.org/RNP/2009/Volume%203/Issue%201/9_RNP-0812-62.pdf)
- Applied Biosystems. (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis chemistry guide. *Applied Biosystemes*, 310. <https://doi.org/10.1002/elps.200900218>.DNA
- Arnelas, I., Invernón, V., González, M., López, E., & Devesa, J. (2012). Manual de laboratorio de Botánica . El herbario . Recolección , procesamiento e identificación de plantas vasculares, 5(2), 15–24.
- Arteaga, L., Perea, M., & Reguero, M. T. (1993). *Brugmansia*: Una especie promisoría para la produccion de alcaloides del tropano. Retrieved from

<http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V21P36-40.pdf>

Baloglu, M. C., Ulu, F., Altunoglu, Y. C., Pekol, S., Alagoz, G., & Ese, O. (2015). Identification, molecular characterization and expression analysis of RPL24 genes in three Cucurbitaceae family members: Cucumber, melon and watermelon. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(6), 1024–1034. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1079144>

Barreto, S. A., Guzmán, J., & Gutiérrez, J. C. (2016). Intoxicación por uso recreativo de floripondio, reportr de caso, 22(1), 68–70.

Bharti Rajendra Kumar. (2012). *Methods of DNA Sequencing- DNA Representation. Dna Sequencing – Methods and Applications*. <https://doi.org/10.5772/2158>

Bohs, L. (2015). *Solanaceae* (Vol. VIII). Retrieved from [http://biologylabs.utah.edu/bohs/PDFs/Lynn/MPCR\\_Vol\\_VIII\\_Solanaceae\\_RVTP2.pdf](http://biologylabs.utah.edu/bohs/PDFs/Lynn/MPCR_Vol_VIII_Solanaceae_RVTP2.pdf)

Boldsystems. (2017). Barcode Of Life Data Systems Handbook. Retrieved from [http://biodiversityadvisor.sanbi.org/wp-content/uploads/2016/05/BOLD\\_Handbook\\_Oct2013.pdf](http://biodiversityadvisor.sanbi.org/wp-content/uploads/2016/05/BOLD_Handbook_Oct2013.pdf)

Boucher, F. C., Zimmermann, N. E., & Conti, E. (2016). Allopatric speciation with little niche divergence is common among alpine Primulaceae. *Journal of Biogeography*, 43(3), 591–602. <https://doi.org/10.1111/jbi.12652>

Bravo, L., González, C., & Le Borgne, S. (2012). Manual de prácticas de Laboratorio de Biología Molecular. Retrieved from

[http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual\\_de\\_Prcticas\\_de\\_BM.pdf](http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual_de_Prcticas_de_BM.pdf)

Bye, R., & Sosa, V. (2013). Molecular Phylogeny of the Jimsonweed Genus *Datura* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 38(3), 818–829.  
<https://doi.org/10.1600/036364413X670278>

Cabi. (2016). *Brugmansia suaveolens* (white angel's trumpet). Retrieved from <http://www.cabi.org/isc/datasheet/107903>

Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>

Citver. (2017). Intoxicación con *Brugmansia* y *Datura*. Retrieved from <https://www.ssaver.gob.mx/citver/files/2017/04/Intoxicación-con-Brugmansia-y-Datura-1.pdf>

Da Cruz, F., Turchetto, A. C., Veto, N., Mondin, C. A., Sobral, M., Almerão, M., & Margis, R. (2013). Phylogenetic analysis of the genus *Hexachlamys* (Myrtaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences and their taxonomic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172(4), 532–543.  
<https://doi.org/10.1111/boj.12036>

Dart, R. (2004). *Medical Toxicology*. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=BfdighlyGiwC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Dart,+R.+\(2004\).+Medical+toxicology.+Philadelphia:+Lippincott+Williams+%26+Wilkins.&ots=Ku83wIr8\\_8&sig=dQicdFvIMc1fvnZxiIBm3woX5T8#v=on](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=BfdighlyGiwC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Dart,+R.+(2004).+Medical+toxicology.+Philadelphia:+Lippincott+Williams+%26+Wilkins.&ots=Ku83wIr8_8&sig=dQicdFvIMc1fvnZxiIBm3woX5T8#v=on)



epage&q&f=false

Dean, B. (2009). *Urarina Society, Cosmology, and History in Peruvian Amazonia*. (U. P. of Florida, Ed.). Gainesville.

Diaz, G. J. (2015). Toxicosis by plant alkaloids in humans and animals in Colombia. *Toxins*, 7(12), 5408–5416. <https://doi.org/10.3390/toxins7124892>

Dyer, M. (2015). Brugmansia Problems: How To Treat Disease And Pests Of Brugmansia. Retrieved from <https://www.gardeningknowhow.com/ornamental/trees/brugmansia/brugmansia-problems.htm>

Ferreira, M., Rodrigues, J., Harakava, R., & Lanza, S. (2012). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial rpoB gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(6), 1419–1424. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.028977-0>

Flores, M. (2011). *Compilación Bibliográfica Brugmansia spp.* Universidad Veracruzana. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/16305413.pdf>

Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., & Kumar, S. (2005a). Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304(1), 64–74. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21026>

García, E. C. (2013). Mecanismos de especiación ecológica en plantas y animales.

- Biológicas Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 14(2), 7–13. Retrieved from <https://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/viewFile/130/129>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), 18(4), 20382. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.Research
- Gonzalez, A. (2014). *Identificación Molecular y Métodos de conservación de Levaduras y Hongos Filamentosos de Muestras provenientes de Antártida*. Universidad de la República. Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/5067/1/uy24-17012.pdf>
- Grant, B. (2015). Brugmansia Plant Care: How To Care For Brugmansia In Ground Outside. Retrieved September 13, 2017, from <https://www.gardeningknowhow.com/ornamental/trees/brugmansia/care-for-brugmansia-outside.htm>
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Han, J., Li, M., Luo, K., Liu, M., Chen, X., & Chen, S. (2011). Identification of Daturae flos and its adulterants based on DNA barcoding technique. NCBI. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260038>
- Hay, A., Gottschalk, M., & Holguin, A. (2012). *Huanduj Brugmansia*. (Florilegium, Ed.) (Ilustrada). Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=haZRugAACAAJ&redir\\_esc=y&hl=es](https://books.google.com.ec/books?id=haZRugAACAAJ&redir_esc=y&hl=es)

- Heckenhauer, J., Barfuss, M. H. J., & Samuel, R. (2016). Universal Multiplexable MatK Primers for DNA Barcoding of Angiosperms. *Applications in Plant Sciences*, 4(6), 1500137. <https://doi.org/10.3732/apps.1500137>
- Herrera, R. (2017). Toxicidad de la especie Brugmasia arbórea L . en la Amazonia Ecuatoriana, (May). Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/317231440\\_Toxicidad\\_de\\_la\\_especie\\_Brugmasia\\_arborea\\_L\\_en\\_la\\_Amazonia\\_Ecuatoriana](https://www.researchgate.net/publication/317231440_Toxicidad_de_la_especie_Brugmasia_arborea_L_en_la_Amazonia_Ecuatoriana)
- Horng, Y. T., Jeng, W. Y., Chen, Y. Y., Liu, C. H., Dou, H. Y., Lee, J. J., ... Soo, P. C. (2015). Molecular analysis of codon 548 in the rpoB gene involved in Mycobacterium tuberculosis resistance to rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1542–1548. <https://doi.org/10.1128/AAC.04374-14>
- Istituto Superiore di Sanità. (2010). Brugmansia arborea (angel trumpet). In *Smart Drugs* (pp. 53–56). Roma: OSSFAD. Retrieved from [http://old.iss.it/binary/drog/cont/Brugmansia\\_arborea.pdf](http://old.iss.it/binary/drog/cont/Brugmansia_arborea.pdf)
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods , Pr. *International Journal of Biomedical Research*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kim, D.-Y., Kwon, K.-R., Kang, W.-M., Jeon, E.-Y., & Jang, J.-H. (2012). Identification and Expression Analysis of Chloroplast p-psbB Gene Differentially Expressed in Wild Ginseng. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 5(4), 192. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.05.013>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics

Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Kuzmina, M. (2013). PCR and Sequencing Protocols - matK, (November). Retrieved from [https://botany.si.edu/projects/DNABarcode/matK\\_PCR\\_&\\_Sequencing\\_Protocols.pdf](https://botany.si.edu/projects/DNABarcode/matK_PCR_&_Sequencing_Protocols.pdf)

Lannacone, J., Ayala, H., & Roman, A. (2005). Efectos Toxicológicos de Cuatro Plantas Sobre el Gorgojo del Maíz *Sitophilus Zea mais* Motschulsky 1855 (Coleóptera: Curculionidae) y Sobre el Gorgojo de las Galletas *Stegobium paniceum* (Linnaeus 1761) (Coleóptera: Anobiidae) en Perú, 69(2), 234–240. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/gayana/v69n2/art03.pdf>

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, (April), 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>

Liu, K., Abdullah, A. A., Huang, M., & Nishioka, T. (2017). Novel Approach to Classify Plants Based on Metabolite Content Similarity. *Hindawi*, 2017(2010), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/5296729>

López-Alvarez, D., López-Herranz, M. L., Betekhtin, A., & Catalán, P. (2012). A DNA Barcoding Method to Discriminate between the Model Plant *Brachypodium distachyon* and Its Close Relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051058>

Luna, L., & Nikichuk, N. (2014). Protocolo para la toma , conservación y transporte de muestras de tejidos vegetales Muestras Compuestas ( Hojas ). Análisis : Muestra Compuesta. Retrieved from <http://cebiof.org.uy/wp->

content/uploads/2014/06/Protocolo-MUESTRA-COMPUESTA-final.pdf

Macrogen. (2017). Sample preparation guide. Retrieved from [https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces\\_sample\\_prep.jsp](https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_prep.jsp)

Mahr, S. (2006). Angel's Trumpet, Brugmansia. Retrieved from <http://wimastergardener.org/files/2015/12/Brugmansia.pdf>

Northwest Association for Biomedical Research. (2012). Lesson Nine Adaptation: Working with a Single DNA Sequence. *Advanced Bioinformatics: Genetic Research / NWABR.ORG*, (C), 1–8. Retrieved from <https://www.nwabr.org/sites/default/files/Analyzing-A-DNA-Sequence-Chromatogram.pdf>

Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57(4), 1159–1181. <https://doi.org/10.2307/3284540>

Palacios, M. (2010). *El Floripondio o Wantuk en el Paisaje Cultural de Cuenca: un Enfoque Desde la Geografía de la Percepción*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1988/1/thg388.pdf>

Penjor, T., Yamamoto, M., Uehara, M., Ide, M., Matsumoto, N., Matsumoto, R., & Nagano, Y. (2013). Phylogenetic Relationships of Citrus and Its Relatives Based on matK Gene Sequences. *PLoS ONE*, 8(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062574>

Phillips, T. (2017). How to Make TBE Buffer in 3 Easy Steps. Retrieved from <https://www.thebalance.com/how-to-make-tbe-buffer-in-3-easy-steps-375493>

- Pino, J., & Alvis, R. (2009). Efecto de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerheim (Solanacea) en el sistema reproductor masculino de ratón. *Revista Peruana de Biología*, 125–127. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v15n2/a20v15n2>
- Preissel, U., & Preissel, H.-G. (2002). *Brugmansia and Datura: Angel's Trumpets and Thorn Apples* (Illustrate). Cornell University: Firefly Books. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=fRIIAAAAYAAJ&q=Brugmansia+and+Datura:+Angel's+Trumpets+and+Thorn+Apples&dq=Brugmansia+and+Datura:+Angel's+Trumpets+and+Thorn+Apples&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiujMvL5N7VAhUJWSYKHfqTBTkQ6AEIJTAA>
- Quattrochi, U. (2012). CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=-37OBQAAQBAJ&pg=PR4&dq=quattrocchi,+2012+pdf&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwih\\_r7f\\_eDVAhXJ7CYKHStBD3AQ6AEITDAF#v=onepage&q=brugmansia&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=-37OBQAAQBAJ&pg=PR4&dq=quattrocchi,+2012+pdf&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwih_r7f_eDVAhXJ7CYKHStBD3AQ6AEITDAF#v=onepage&q=brugmansia&f=false)
- Rawat, S., Joshi, G., Annapurna, D., Arunkumar, A. N., & Karaba, N. N. (2016). Standardization of DNA Extraction Method from Mature Dried Leaves and ISSR-PCR Conditions for *Melia dubia* Cav . — A Fast Growing Multipurpose Tree Species, (March), 437–445. Retrieved from [https://file.scirp.org/pdf/AJPS\\_2016031015552569.pdf](https://file.scirp.org/pdf/AJPS_2016031015552569.pdf)
- Ruiz, G. (2013). *Mi cropropagación in vitro de floripondio blanco (Brugmansia candida) como estrategia de los programas de arborización para el Distrito Metropolitano de*

Quito. Escuela Politécnica del Ejercito. Retrieved from  
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/6498>

Rusyanthini, E. ., Wirajana, I. ., & Yowani, S. C. (2015). Optimization of Annealing Temperature for Amplification of 507 bp fragment of rpoB Gene of Clinical Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolate 86. *Indonesia Journal of Biomedical Science*, 4(4), 279–282. Retrieved from <https://ijbs-udayana.org/index.php/ijbs/article/viewFile/20/33>

Sahil, P., Tejas, B., Hiren, B., Pratibha, S., & Abhay, K. (2015). Polymerase Chain Reaction ( PCR ). *Magazine of Agricultural and Biological Sciences*, (February). <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005339>

Saldamando, C. (2010). La Posible Especiación Simpátrica o Alosimpátrica de Spodoptera Frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae). *Boletín Del Museo Entomológico. Francisco Luis Gallego.*, 9–26. Retrieved from <http://ciencias.medellin.unal.edu.co/museos/entomologico/images/Boletin/2010-12/3.pdf>

Sciencelearn. (2009). Extracción de ADN. Retrieved September 14, 2017, from <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction>

Shibl, A. A., Haroon, M. F., Ngugi, D. K., Thompson, L. R., & Stingl, U. (2016). Distribution of Prochlorococcus Ecotypes in the Red Sea Basin Based on Analyses of rpoC1 Sequences. *Frontiers in Marine Science*, 3(June), 104. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00104>

Sol-Church, K., & Frenck, J. (2015). Sequencing Guidelines. *Biomolecular Core Facility*

- AI Dupont Hospital for Children*, (302). Retrieved from [http://www.nemoursresearch.org/cores/bcl/forms/BCL\\_Sequencing\\_Troubleshooting\\_Guide.pdf](http://www.nemoursresearch.org/cores/bcl/forms/BCL_Sequencing_Troubleshooting_Guide.pdf)
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2003). Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *Statistical Science*, 18(2), 256–267. <https://doi.org/10.1214/ss/1063994980>
- Soltis, L. (2002). Soltis Lab CTAB DNA Extraction Protocol, 23–24. Retrieved from <https://www.floridamuseum.ufl.edu/museum-voices/soltis-lab/files/2014/02/CTAB-DNA-Extraction.pdf>
- Suárez, V., Perez, L., Díaz, G., & Abraham, C. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas Methodology and applications of flow cytometry for immunophenotyping of acute leukemias, 31(3), 242–253. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v31n3/hih03315.pdf>
- Susann, W., & Quandt, D. (2009). Universal primers for the amplification of the plastid trnK/matK region in land plants. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 67(1), 41–47. <https://doi.org/10.3989/ajbm>.
- Tallei, T. E., & Kolondam, B. J. (2015). DNA Barcoding of Sangihe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using matK Gene. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(1), 41–47. <https://doi.org/10.4308/hjb.22.1.41>
- Teerawarunyoo, P., Suwannapoom, C., Sucharitakul, P., Buddhachat, K., Pradit, W., Nganvongpanit, K., & Chomdej, S. (2017). Parapatric speciation found in limnonectes (Dicroglossidae) species in Thailand. *Genetics and Molecular Research*, 16(4). <https://doi.org/10.4238/gmr16039856>



Thermo Fisher Scientific. (2014). Thermo Scientific Phire Tissue Direct PCR Master Mix, 4–6. Retrieved from [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012959\\_Phire\\_Plant\\_Direct\\_PCR\\_MasterMixes\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012959_Phire_Plant_Direct_PCR_MasterMixes_UG.pdf)

Thermo Fisher Scientific. (2017a). Green features SYBR Safe DNA Gel Stain An alternative to ethidium bromide stain. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/sybr-safe.html>

Thermo Fisher Scientific. (2017b). User Guide: Platinum SuperFi PCR Master Mix. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12358250?SID=srch-srp-12358250>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). PRODUCT INFORMATION - Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use. *Rev. Date 25 November 2016, 2016(November), 0–2.* Retrieved from [file:///C:/Users/renat/Downloads/MAN0013050\\_GeneRuler\\_1kb\\_Plus\\_DNALadder\\_RTU\\_50ug\\_UG \(3\).pdf](file:///C:/Users/renat/Downloads/MAN0013050_GeneRuler_1kb_Plus_DNALadder_RTU_50ug_UG%20(3).pdf)

Topik, H., Yukawa, T., & Ito, M. (2005). Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from plastid matK and nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Plant Research*, 118(4), 271–284. <https://doi.org/10.1007/s10265-005-0217-3>

Tropicos. (2017). tropicos. Retrieved August 15, 2017, from <http://www.tropicos.org/>

- Valcárcel, V. (2007). Puntos clave en el diseño y elaboración de una filogenia molecular. *Universidad Autónoma de Madrid*, 1–3. Retrieved from [https://www.uam.es/docencia/ocw/cursos/valcarcelfilogenia/1\\_W\\_Text\\_2.2.pdf](https://www.uam.es/docencia/ocw/cursos/valcarcelfilogenia/1_W_Text_2.2.pdf)
- Viana, J. P. G., Borges, A. N. C., Lopes, A. C. A., Gomes, R. L. F., Britto, F. B., Lima, P. S. C., & Valente, S. E. S. (2015). Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 14(4), 18003–8. <https://doi.org/10.4238/2015.December.22.26>
- Victoria Avenue Forever. (2015). Brugmansia candida Angel's Trumpet, 110. Retrieved from <http://www.victoriaavenueforever.org/wp-content/uploads/2015/08/Angels-Trumpet.pdf>
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2011). DNA barcoding in plants : Taxonomy in a new perspective DNA barcoding in plants : taxonomy in a new perspective. *Current Science*, 99(11), 1530–1541.
- Wilson, K. M., Schembri, M. A., Baker, P. D., & Saint, C. P. (2000). Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 332–338. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.332-338.2000>
- Wu, Y., Xu, L., Cheng, L., Wang, B., & Zhao, R. (2015). Identificación molecular de ADN de plantas medicinales *Datura* usando secuencia de código de barras ITS2. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/26930979/?i=2&from=/22260038/related>
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature*

*Reviews Genetics*, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>

## Anexos

**Anexo 1. Tabla de Georreferencias de muestras de *Brugmansias***

N°	Código Herbario	Lugar	Provincia	Coordenadas	Identificación Morfológica
1	3288	Mindoloma	Pichincha	0°00'42.0"S 8°44'39.1"W	<i>Brugmansia suaveolens</i>
2	3315	Vía Guasaganda el Guayacan	Pichincha	0°48'09.5"S 79°09'18.9"W	<i>Brugmansia x candida</i>
3	3337	Pasochoa	Pichincha	0°27'31.8"S 78°25'25.9"W	<i>Brugmansia sanguinea</i>
4	3341	Pasochoa	Pichincha	0°29'02.1"S 78°25'53.1"W	<i>Brugmansia sanguinea</i>
5	3344	Pasochoa	Pichincha	0°30'17.4"S 78°26'29.5"W	<i>Brugmansia arborea</i>
6	3345	Pasochoa	Pichincha	0°30'58.4"S 78°26'30.8"W	<i>Brugmansia arborea</i>
7	3356	Tabacundo	Pichincha	0°30'58.4"S 78°26'30.8"W	<i>Brugmansia x candida</i>
8	3363	Papallacta	Pichincha	0°02'45.9"N 78°14'17.4"W	<i>Brugmansia sanguinea</i>
9	3367	Quito	Pichincha	0°22'35.3"S 78°08'28.9"W	<i>Brugmansia x candida</i>
10	3375	Jatun Sacha	Napo	0°18'16.1"S 78°33'17.4"W	<i>Brugmansia insignis</i>
11	3384	Museo Misahualli	Napo	1°04'15.9"S 77°37'22.6"W	<i>Brugmansia x candida</i>
12	3385	Museo Misahualli	Napo	1°03'09.0"S 77°41'59.8"W	<i>Brugmansia suaveolens</i>

<b>13</b>	3392	Vía Macas	Morona Santiago	1°03'09.0"S 77°41'59.8"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>14</b>	3445	Lasso Vía Panamericana	Cotopaxi	2°08'33.7"S 78°02'10.1"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>15</b>	3446	Lasso Vía Panamericana	Cotopaxi	0°45'06.9"S 78°36'57.4"W	<i>Brugmansia sanguinea</i>
<b>16</b>	3447	Lasso Vía Panamericana	Cotopaxi	0°45'06.9"S 78°36'57.4"W	<i>Brugmansia x candida</i>
<b>17</b>	3448	Vía Llanganates	Cotopaxi	0°45'06.9"S 78°36'57.4"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>18</b>	3449	Belisarioquevedo	Cotopaxi	1°03'19.9"S 78°30'55.2"W	<i>Brugmansia aurea</i>
<b>19</b>	3450	Latacunga	Cotopaxi	0°59'08.8"S 78°35'03.9"W	<i>Brugmansia sanguinea</i>
<b>20</b>	3473	Jardín Botánico	Pichincha	0°55'24.8"S 78°37'22.7"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>21</b>	3474	Jardín Botánico	Pichincha	0°11'11.2"S 78°29'09.5"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>22</b>	3475	Jardín Botánico	Pichincha	0°11'11.2"S 78°29'09.5"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>23</b>	3476	Jardín Botánico	Pichincha	0°11'11.2"S 78°29'09.5"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>24</b>	3477	Jardín Botánico	Pichincha	0°11'11.2"S 78°29'09.5"W	<i>Brugmansia versicolor</i>
<b>25</b>	3478	Jardín Botánico	Pichincha	0°11'11.2"S 78°29'09.5"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>26</b>	3501	Huaca Carchi	Carchi	0°37'57.1"N 77°43'15.1"W	<i>Brugmansia aurea</i>

<b>27</b>	3502	Huaca Carchi	Carchi	0°37'57.1"N 77°43'15.1"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>28</b>	3503	Huaca Carchi	Carchi	0°37'57.1"N 77°43'15.1"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>29</b>	3504	Huaca Carchi	Carchi	0°38'34.7"N 77°42'41.1"W	<i>Brugmansia aurea</i>
<b>30</b>	3505	Huaca Carchi	Carchi	0°38'34.7"N 77°42'41.1"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>31</b>	3506	Huaca Carchi	Carchi	0°38'34.7"N 77°42'41.1"W	<i>Brugmansia vulcanicola</i>
<b>32</b>	3507	La Mana	Cotopaxi	0°56'39.6"S 79°14'19.7"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>33</b>	3508	La Mana	Cotopaxi	0°56'01.6"S 79°14'03.9"W	<i>Brugmansia versicolor</i>
<b>34</b>	3509	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia x candida</i>
<b>35</b>	3511	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia versicolor</i>
<b>36</b>	3512	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>37</b>	3513	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>38</b>	3514	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia arborea</i>
<b>39</b>	3515	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia</i> spp
<b>40</b>	3516	Cumbaya	Pichincha	0°11'55.0"S 78°25'08.4"W	<i>Brugmansia</i> spp

Elaborado por: El Autor, 2017

## **Anexo 2. Preparación de reactivos para extracción de ADN**

Es importante que previo a la extracción de ADN se preparen los reactivos necesarios para llevar a cabo este proceso y es recomendable que no se prolongue el uso de los mismos para evitar contaminación, así como la obtención de resultados positivos; primero se elaboró el Buffer de extracción lisis, el cual consiste en pesar 0,6055 g de Tris, 0,74 g de EDTA, 1,461 g NaCl y se afora a 50 mL con agua destilada, después se ajusta el pH de la mezcla a 8, luego se prepara la solución SDS 95% (5,25 g y 44,75 mL de agua), a continuación se prepara la solución Acetato de Potasio 5M (9,814 g de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  y se afora con agua destilada a 50 mL; a continuación se prepara la solución Fenol Cloroformo en proporción (1:1) para esto pesamos 50 g de fenol y 50 mL de cloroformo, finalmente se elaboró TBE 10x, para cual se pesa 54 g de Tris, 27,5 g de Ácido Bórico y 2.93 g de EDTA(0,5M) y se aforo a 500 mL (L. Soltis, 2002).

**Elaborado por:** El Autor, 2017

### **Anexo 3. Reactivos para electroforesis y gel de agarosa**

El TBE 10<sub>x</sub>: contiene Tris 54 g, ácido bórico 27 g y EDTA (0.5M) 2,93 g, aforado a 500 mL con agua destilada; para obtener TBE 1<sub>x</sub> se tomó la proporción 1:9, 100 mL TBE 10<sub>x</sub> y se afora 1000 mL con agua destilada.

Tampón de carga: se prepara con 25 mg de Xileno-cianol, 4 g de sucrosa y se afora a 10 mL con agua destilada finalmente se autoclava (Phillips, 2017)

**Elaborado por:** El Autor 2017



#### Anexo 4 Resultados de la extracción de ADN y Amplificación

N°	Código Herbario	Especies	ADN	Región <i>matK</i>	Región <i>rpoB</i>	Región <i>rpoC1</i>
1	3288	<i>Brugmansia suaveolens</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
2	3315	<i>Brugmansia x candida</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
3	3337	<i>Brugmansia sanguinea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
4	3341	<i>Brugmansia sanguinea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
5	3344	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
6	3345	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
7	3356	<i>Brugmansia x candida</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
8	3363	<i>Brugmansia sanguinea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
9	3367	<i>Brugmansia x candida</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
10	3375	<i>Brugmansia insignis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
11	3384	<i>Brugmansia x candida</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
12	3385	<i>Brugmansia suaveolens</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
13	3392	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
14	3445	<i>Brugmansia spp</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
15	3446	<i>Brugmansia sanguinea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)

16	3447	<i>Brugmansia x candida</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
17	3448	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
18	3449	<i>Brugmansia aurea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
19	3450	<i>Brugmansia sanguinea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
20	3473	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
21	3474	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
22	3475	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
23	3476	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
24	3477	<i>Brugmansia versicolor</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
25	3478	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
26	3501	<i>Brugmansia aurea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
27	3502	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
28	3503	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
29	3504	<i>Brugmansia aurea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
30	3505	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
31	3506	<i>Brugmansia vulcanicola</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
32	3507	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
33	3508	<i>Brugmansia versicolor</i>	(+)	(+)	(+)	(+)

34	3509	<i>Brugmansia x candida</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
35	3511	<i>Brugmansia versicolor</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
36	3512	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
37	3513	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
38	3514	<i>Brugmansia arborea</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
39	3515	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)
40	3516	<i>Brugmansia</i> spp	(+)	(+)	(+)	(+)

**Elaborado por:** El Autor 2017

## **Anexo 5. Preparación de muestras para secuenciación**

Se colocó en microtubos los productos PCR en cantidad 20  $\mu\text{L}$  por cada tubo, correctamente etiquetados, a continuación, se colocó parafilm en la tapa de los tubos para evitar que se derrame la muestra durante el transporte, adicional se debe colocar 20  $\mu\text{L}$  de primer forward en tubos separados de todos primers utilizados, también se colocaron los tubos dentro de fundas ziploc, mismas que fueron selladas al vacío para mantener los tubos sin movimiento. (Macrogen, 2017)

**Elaborado por:** El Autor, 2017

# **Anexo 6. Resultados de Blastn de la secuenciación de muestras de *Brugmansia***

Nº	Código Herbario	Query Length	Description	Query cover	Identity	Reference
1	3288	486	<i>Brugmansia suaveolens</i> isolate R049 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	83%	94%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
2	3315	836	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	94%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3	3337	869	<i>Brugmansia sanguinea</i> isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	48%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
4	3341	897	<i>Brugmansia sanguinea</i> isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	75%	97%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
5	3344	875	<i>Brugmansia arborea</i> voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
6	3345	871	<i>Brugmansia arborea</i> voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
7	3356	921	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	96%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

8	3363	852	<i>Brugmansia sanguinea</i> isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
9	3367	910	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
10	3375	915	<i>Brugmansia suaveolens</i> isolate R049 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	85%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
11	3384	919	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	97%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
12	3385	846	<i>Brugmansia suaveolens</i> isolate R049 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
13	3392	911	<i>Brugmansia arborea</i> voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	87%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
14	3445	921	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	81%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
15	3446	1075	<i>Brugmansia sanguinea</i> isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and	97%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

			<i>maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</i>			
16	3447	838	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	80%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
17	3448	846	<i>Brugmansia sanguinea isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</i>	94%	97%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
18	3449	918	<i>Brugmansia aurea isolate Bru001 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</i>	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
19	3450	846	<i>Brugmansia sanguinea isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</i>	83%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
20	3473	918	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	85%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
21	3474	837	<i>Brugmansia arborea voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</i>	96%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
22	3475	915	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	85%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
23	3476	831	<i>Brugmansia arborea voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</i>	93%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

24	3477	925	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	85%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
25	3478	833	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	94%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
26	3501	924	<i>Brugmansia aurea</i> isolate Bru001 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
27	3502	853	<i>Brugmansia arborea</i> voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	92%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
28	3503	938	<i>Brugmansia arborea</i> voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
29	3504	920	<i>Brugmansia sanguinea</i> isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	81%	91%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
30	3505	935	<i>Brugmansia arborea</i> voucher PS1147MT02 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
31	3506	943	<i>Brugmansia sanguinea</i> isolate R047 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	83%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
32	3507	836	<i>Brugmansia x candida</i> isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>



			<i>maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>			
33	3508	934	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	83%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
34	3509	927	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
35	3511	498	(-)	(-)	(-)	(-)
36	3512	507	(-)	(-)	(-)	(-)
37	3513	743	(-)	(-)	(-)	(-)
38	3514	830	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	95%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
39	3515	839	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	94%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
40	3516	839	<i>Brugmansia x candida isolate R048 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</i>	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

Elaborado por: El Autor 2017

**Anexo 7. Resultados de Bold system de la secuenciación de muestras de *Brugmansia***

N°	Código Herbario	Query Length	Description	Identity	Reference
1	3288	359	<i>Brugmansia arborea</i>	92.69%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVT1977-13">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVT1977-13</a>
2	3315	712	<i>Brugmansia arborea</i>	97.37 %	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
3	3337	434	<i>Datura inoxia</i>	79.75%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVW3842-13">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVW3842-13</a>
4	3341	611	<i>Brugmansia arborea</i>	92.35%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
5	3344	758	<i>Brugmansia arborea</i>	99.80%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
6	3345	768	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
7	3356	758	<i>Brugmansia arborea</i>	99.1%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
8	3363	755	<i>Brugmansia arborea</i>	98.97%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
9	3367	767	<i>Brugmansia arborea</i>	99.36%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>

10	3375	742	<i>Brugmansia arborea</i>	98.83%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
11	3384	764	<i>Brugmansia arborea</i>	99.36%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
12	3385	763	<i>Brugmansia arborea</i>	99.1%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
13	3392	752	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
14	3445	720	<i>Brugmansia arborea</i>	98%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
15	3446	681	<i>Brugmansia arborea</i>	97.25%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
16	3447	633	<i>Brugmansia arborea</i>	98.92%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
17	3448	706	<i>Brugmansia arborea</i>	96.66%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
18	3449	918	<i>Brugmansia aurea</i>	99.98%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVK3989-11">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVK3989-11</a>
19	3450	653	<i>Brugmansia arborea</i>	96.66%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
20	3473	762	<i>Brugmansia arborea</i>	99.74%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
21	3474	687	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
22	3475	726	<i>Brugmansia arborea</i>	96.66%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
23	3476	736	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>

24	3477	758	<i>Brugmansia arborea</i>	99.35%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
25	3478	751	<i>Brugmansia arborea</i>	99.22%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
26	3501	924	<i>Brugmansia aurea</i>	99.98%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVK3989-11">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=GBVK3989-11</a>
27	3502	761	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
28	3503	760	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
29	3504	578	<i>Brugmansia arborea</i>	88.07%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
30	3505	754	<i>Brugmansia arborea</i>	99.90%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
31	3506	753	<i>Brugmansia arborea</i>	98.84%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
32	3507	761	<i>Brugmansia arborea</i>	99.22%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
33	3508	761	<i>Brugmansia arborea</i>	99.22%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
34	3509	759	<i>Brugmansia arborea</i>	99.22%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
35	3511	498	(-)	(-)	(-)
36	3512	507	(-)	(-)	(-)
37	3513	743	(-)	(-)	(-)
38	3514	731	<i>Brugmansia arborea</i>	98.3%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>

39	3515	759	<i>Brugmansia arborea</i>	99.22%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>
40	3516	755	<i>Brugmansia arborea</i>	99.09%	<a href="http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10">http://boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=HOSAM064-10</a>

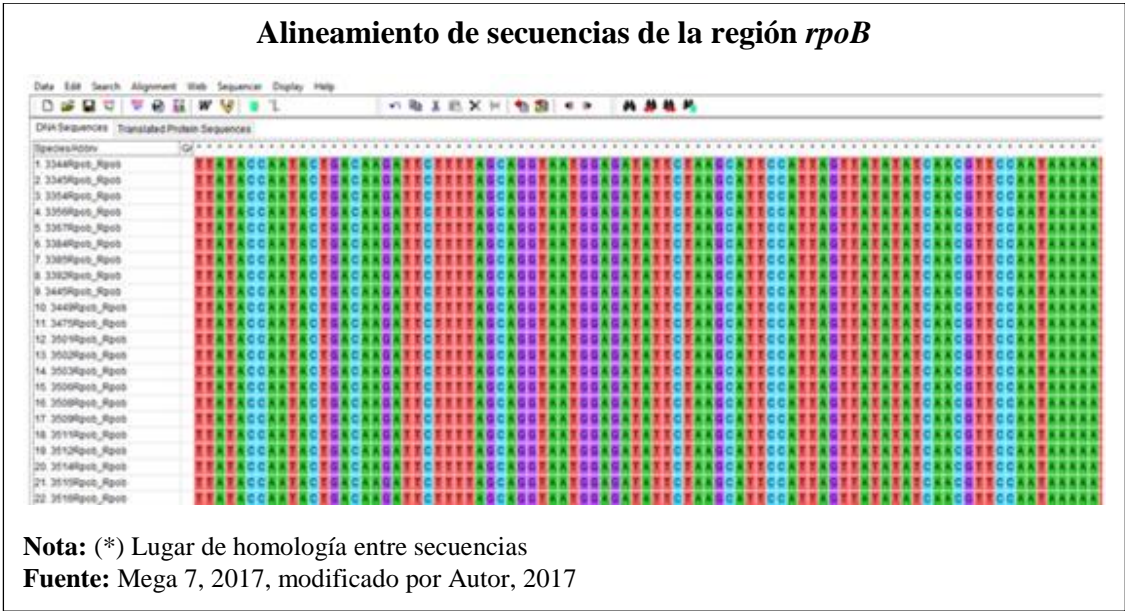
**Elaborado por:** El Autor 2017

## Anexo 8. Calidad de las secuencias

Nº	Código Herbario	Especies	Región matK	Región rpoB	Región rpoC1
1	3288	<i>Brugmansia suaveolens</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
2	3315	<i>Brugmansia x candida</i>	Baja	Baja	Aceptable
3	3337	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
4	3341	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Baja	Aceptable	Baja
5	3344	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
6	3345	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
7	3356	<i>Brugmansia x candida</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
8	3363	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
9	3367	<i>Brugmansia x candida</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
10	3375	<i>Brugmansia insignis</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
11	3384	<i>Brugmansia x candida</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
12	3385	<i>Brugmansia suaveolens</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
13	3392	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
14	3445	<i>Brugmansia spp</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
15	3446	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
16	3447	<i>Brugmansia x candida</i>	Baja	Aceptable	Baja
17	3448	<i>Brugmansia spp</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
18	3449	<i>Brugmansia aurea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
19	3450	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
20	3473	<i>Brugmansia spp</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
21	3474	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
22	3475	<i>Brugmansia spp</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
23	3476	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
24	3477	<i>Brugmansia versicolor</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
25	3478	<i>Brugmansia spp</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
26	3501	<i>Brugmansia aurea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
27	3502	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
28	3503	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
29	3504	<i>Brugmansia aurea</i>	Baja	Aceptable	Aceptable
30	3505	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
31	3506	<i>Brugmansia vulcanicola</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
32	3507	<i>Brugmansia spp</i>	Bajo	Aceptable	Baja
33	3508	<i>Brugmansia versicolor</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
34	3509	<i>Brugmansia x candida</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
35	3511	<i>Brugmansia versicolor</i>	Bajo	Aceptable	Aceptable
36	3512	<i>Brugmansia spp</i>	Bajo	Aceptable	Aceptable
37	3513	<i>Brugmansia spp</i>	Bajo	Baja	Aceptable
38	3514	<i>Brugmansia arborea</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
39	3515	<i>Brugmansia spp</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable
40	3516	<i>Brugmansia spp</i>	Aceptable	Aceptable	Aceptable

Elaborado por: El Autor 2017

**Anexo 9. Alineamiento de secuencias de la región *rpoB* de especies del género *Brugmansia***



**Elaborado por:** El Autor 2017